

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**  
федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

---

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Тема работы
<b>Разработка технологии получения и методик стандартизации активной фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы гиполипидемического лекарственного средства на основе полисахаридов из листьев <i>Betula pendula</i> Roth</b>

УДК 661.12:547.458

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ81	Гурьев Артем Михайлович		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Белоусов Михаил Валерьевич	д.фарм.н,		

**КОНСУЛЬТАНТЫ:**

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Якимова Татьяна Борисовна	к.э.н., доцент		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ООД	Горбенко Михаил Владимирович	к.т.н, доцент		

**ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:**

Руководитель ООП 18.04.01 Химическая технология	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор ИШХБМТ	Романенко С.В.	д.х.н.		

### Запланированные результаты обучения по программе

Код	Результат обучения
Универсальные компетенции	
P1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий
P2	Способен управлять проектом на всех этапах его жизненного цикла
P3	Способен организовывать и руководить работой команды, вырабатывая командную стратегию для достижения поставленной цели
P4	Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном языке, для академического и профессионального взаимодействия
P5	Способен анализировать и учитывать разнообразие культур в процессе межкультурного взаимодействия
P6	Способен определить и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки
Общепрофессиональные и профессиональные компетенции	
P7	Способен использовать глубокие естественно-научные, математические и инженерные знания в области современных технологий химического производства для решения междисциплинарных инженерных задач
P8	Способен формулировать и решать научные задачи, проводить теоретические и экспериментальные исследования в области создания новых соединений, материалов и изделий биомедицинского назначения и их физико-химического анализа, с использованием современных подходов к обработке и анализу информации
P9	Способен оптимизировать химико-технологические процессы и управлять ими для создания новых соединений, материалов и изделий биомедицинского назначения и их физико-химического анализа, конкурентоспособных на мировом рынке, соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда, выполнять требования по защите окружающей среды в качестве члена и/или руководителя коллектива
P10	Способен осуществлять педагогическую деятельность в области профессиональной подготовки

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**  
федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

УТВЕРЖДАЮ:  
Руководитель ООП  
18.04.01 Химическая технология  
\_\_\_\_\_  
С.В.Романенко  
09.03.2020 г.

**ЗАДАНИЕ  
на выполнение выпускной квалификационной работы**

В форме:

магистерской диссертации

Студенту:

группа	ФИО
9ДМ81	Гурьев Артем Михайлович

Тема работы:

**Разработка технологии получения и методик стандартизации активной  
фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы  
гиполипидемического лекарственного средства на основе полисахаридов из листьев  
Betula pendula Roth**

Утверждена приказом директора (дата, номер)

Срок сдачи студентом выполненной работы:

05.06.2020 г.

**ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:**

<p><b>Исходные данные к работе</b> (наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</p>	<p>Объектом исследования является полисахарид L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронан, полученный из листьев березы.</p>
<p><b>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</b> (аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</p>	<p>Литературный обзор Объекты и методы исследования Обсуждение результатов исследования Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение Социальная ответственность Заключение по работе</p>

<b>Перечень графического материала</b> <i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i>		Презентация
<b>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</b> <i>(с указанием разделов)</i>		
<b>Раздел</b>	<b>Консультант</b>	
1. Обзор литературы 3.Определение оптимальных технологических параметров получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы	д.фарм.н, Белоусов Михаил Валерьевич	
2. Birch polysaccharides isolation, description and hypolipidemic activity	д.фарм.н, профессор Белоусов Михаил Валерьевич к.фил.н, доцент кафедры ОИЯ Степура Светлана Николаевна	
4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	к.э.н., доцент ОСГН Якимова Татьяна Борисовна	
5. Социальная ответственность	к.т.н., доцент ООД Горбенко Михаил Владимирович	
<b>Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:</b>		
<b>На русском языке:</b> 1. Обзор литературы. 3.Определение оптимальных технологических параметров получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы. 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение. 5. Социальная ответственность		
<b>На английском языке:</b> 2. Birch polysaccharides isolation, description and hypolipidemic activity		

<b>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</b>	09.03.2020 г.
---	---------------

**Задание выдал руководитель:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Белоусов Михаил Валерьевич	д.фарм.н,		09.03.2020 г.

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ81	Гурьев Артем Михайлович		09.03.2020 г.

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА  
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И  
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ81	Гурьев Артем Михайлович

Школа	ИШХБМТ		
Уровень образования	Магистр	Направление	Химическая технология

**Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:**

1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	Стоимость выполняемых работ, материальных ресурсов, согласно применяемой техники и технологии, в соответствии с рыночными ценами. Оклады в соответствии с окладами сотрудников «НИ ТПУ»
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	- районный коэффициент- 1,3; - накладные расходы – 16%; - норма амортизации 20%.
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	В соответствии с налоговым кодексом Российской Федерации. Отчисления во внебюджетные фонды – 30,2 %

**Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:**

1. <i>Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ</i>	Анализ потенциальных потребителей, анализ конкурентных технических решений, оценка готовности проекта к коммерциализации
2. <i>Разработка устава научно-технического проекта</i>	Определение целей и результатов проекта, организационной структуры проекта
3. <i>Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок</i>	Определение этапов работ; определение трудоемкости работ; разработка графика Ганта. Определение затрат на проектирование (смета затрат)
4. <i>Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности</i>	Оценка эффективности проекта

**Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):**

1. Оценка конкурентоспособности технических решений
2. Иерархическая структура работ проекта
3. Календарный план-график выполнения проекта
4. организационная структура проекта
5. Потенциальные риски

<b>Дата выдачи задания для раздела по линейному графику</b>	
---	--

**Задание выдал консультант:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Якимова Т.Б.	К.Э.Н.		

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ81	Гурьев Артем Михайлович		

## ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ81	Гурьев Артем Михайлович

Школа	Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий		
Уровень образования	Магистр	Направление	Химическая технология

Тема ВКР:

Разработка технологии получения и методик стандартизации активной фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы гипополипидемического лекарственного средства на основе полисахаридов из листьев <i>Betula pendula</i> Roth	
<b>Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:</b>	
1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	Объектом исследования является полисахарид L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронан, полученный из листьев березы. Рабочая зона – химическая научно-исследовательская лаборатория кафедры фармацевтического анализа СибГМУ. Область применения – фармацевтика.
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<b>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;</li> <li>– организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.</li> </ul>	Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 27.12.2018); -ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования; - СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений. -ПНД Ф 12.13.1-03. Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения).
<b>2. Производственная безопасность:</b> 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов 2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия	1.Отклонение показателей микроклимата 2.Превышение уровня шума 3.Отсутствие или недостаток естественного света 4.Недостаточная освещенность рабочей зоны 5.Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека 6. Взаимодействие с химическими реагентами и смесями
<b>3. Экологическая безопасность:</b>	Выбросы в атмосферу постоянные и периодические технологические, вентиляционные и неорганизованные выбросы в атмосферу через трубы,

	аэрационные фонари и вентиляционные шахты и предельно допустимые концентрации веществ в атмосферном воздухе.
<b>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</b>	1. Локальные возгорания и пожар 2. Превышение ПДК аэрозолей веществ, используемых в производстве.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
--	--

**Задание выдал консультант:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ООД	Горбенко Михаил Владимирович	к.т.н., доцент		

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ81	Гурьев Артем Михайлович		

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа изложена на 115 страницах, содержит 19 рисунков, 50 таблиц, 120 источников.

Ключевые слова: полисахариды березы, секвестранты желчных кислот, гиполипидемическая активность, L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронан.

Объектом исследования является полисахарид L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронан, полученный из листьев березы.

Цель работы – оптимизация технологии активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы.

В процессе исследования проводились: выделение полисахаридов из растительного сырья, определение химической структуры полисахаридов физико-химическими методами, исследование гиполипидемической активности, экспериментальное обоснование технологических параметров лабораторной технологии получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы.

Полученные результаты: оптимизирована лабораторная технология получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы.

Область применения: полученные результаты имеют практическую и теоретическую значимость, разработанные технологии могут быть востребованы в медицине и здравоохранении, кардиологии, фармакологии, фармацевтической технологии, фармацевтической промышленности.

Экономическая значимость работы: проект эффективен и конкурентоспособен.



## **НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ**

ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств.

Федеральный закон от 12.04.2010г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

ГОСТ Р 52550-2006 «Производство лекарственных средств. Организационно-технологическая документация»

ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения».

ОСТ 42-2-72 «Лекарственные средства. Порядок установления сроков годности».

ОСТ 42-504-96 «Стандарт отрасли. Контроль качества лекарственных средств на промышленных предприятиях и в организациях. Общие положения».

ОСТ 64-02-003-2002 «Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения».

ГФ XIII

ФЗ № 61-ФЗ от 12.04.2010 «О лекарственных средствах».

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	11
1. Литературный обзор .....	13
2. Birch polysaccharides isolation, description and hypolipidemic activity .....	22
2.1. Methods and materials .....	26
2.2. Results and discussion.....	31
3. Определение оптимальных технологических параметров получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы.....	40
3.1. Материалы и методы исследования .....	40
3.2. Разработка технологической схемы .....	40
3.3. Влияние технологических параметров на выход и показатели качества фармацевтической субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана .....	42
3.4. Оптимизированная технология получения субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана .....	65
4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ .....	69
4.1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ .....	69
4.2. Разработка устава научно-технического проекта .....	71
4.3. Планирование процесса управления научно-техническим проектом .....	73
4.4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности проекта .....	85
5. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ .....	88
5.1. Правовые и организационные вопросы обеспечения .....	88
5.2. Производственная безопасность.....	93
5.3. Экологическая безопасность .....	98
5.4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях .....	100
6. Заключение.....	105
Список публикаций .....	106
Список использованной литературы .....	107

## ВВЕДЕНИЕ

В современной стратегии медикаментозной коррекции дислипидемий и первичной/вторичной профилактики ССЗ центральное место занимает терапия статинами. Вместе с тем, в результате широкомасштабных клинических исследований последних лет было показано, что монотерапия статинами, даже в высоких дозах, у от 23 до 76% пациентов высокого риска, не приводит к достижению целевых значений липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛПНП) [117], а у пациентов с гетерозиготной наследственной гиперхолестеринемией неэффективность статинов регистрировалась в 80% случаев [86]. Результатом этих и других исследований явилось понимание, что в большинстве случаев предпочтительна комбинированная гиполипидемическая терапия, включающая, наряду со статинами другие классы гипохолестеринемических средств [52,64,79,101,107]. Также существуют пациенты, которые плохо переносят статины или не могут их принимать в высоких дозах (лица с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), пациенты старше 75 и моложе 21 лет, пациенты с хронической болезнью почек (ХБП) 3-5 стадии и находящиеся на диализе). В таких случаях также остро встает вопрос о замене статинов другими лекарственными средствами, позволяющими эффективно снижать уровень ХС-ЛПНП [61]. Кроме того, несмотря на огромный спрос, на рынке отсутствуют препараты, позволяющие проводить эффективную профилактику при небольших отклонениях показателей холестеринового обмена – в ситуациях, когда нет прямых показаний к назначению статинов.

Настоящая работа является частью комплексного междисциплинарного проекта по разработке оригинального отечественного лекарственного средства для профилактики и лечения атеросклероза, позволяющего блокировать энтерогепатическую циркуляцию желчных кислот путем их связывания в просвете кишечника и последующего выведения.

Целью данной работы является оптимизация технологии активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы.

В процессе исследования проводились: выделение полисахаридов из растительного сырья, определение химической структуры полисахаридов физико-химическими методами, исследование гиполипидемической активности, экспериментальное обоснование технологических параметров получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы.

*Научная новизна:*

- 1) Впервые получены детальные данные о химической структуре полисахарида березы L-рамнопиранозил-6-метил-d-галактуронана.
- 2) Впервые установлены эффективные дозировки полисахарида березы..

*Практическая значимость:*

- 1) Обоснованы технологические параметры получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы.
- 2) Определена ресурсоэффективность проекта.
- 3) Детализованы требования к охране труда и окружающей среды при организации исследований и производства по результатам проекта.

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

По данным ВОЗ, атеросклероз в развитых странах в последнее десятилетие вышел на первое место как причина заболеваемости. Потери трудоспособности, развитие инвалидности и рост смертности вследствие атеросклероза опередили аналогичные потери, наступающие от онкологических, инфекционных заболеваний, травм и других болезней.

Атеросклероз обуславливает примерно половину смертных случаев в целом по популяции и является причиной около 1/3 летальных исходов у лиц в возрасте 35–65 лет.

В настоящее время в большинстве стран увеличивается распространенность атеросклероза и его осложнений – прежде всего, ишемической (коронарной) болезни сердца и мозгового инсульта. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения, ежегодно в мире от сердечно-сосудистых заболеваний погибает более 17 млн. человек, причем 90% смертей приходится на эти основные осложнения атеросклероза; ишемическая болезнь сердца является основной причиной смерти в индустриально развитых странах.

В России на долю сердечно-сосудистых заболеваний приходится 53-55% общей смертности, и она продолжает расти, в то время как в США и во многих западноевропейских странах (Швеции, Франции, Нидерландах) этот показатель постепенно снижается за счет эффективной борьбы с атеросклерозом и его осложнениями. Несмотря на это, к 2020 году атеросклероз может стать главной причиной смертности населения во всем мире.

В настоящее время на территории Российской Федерации для фармакотерапевтической коррекции гиперлипидемических состояний и, в частности, гиперхолестеринемии разрешены к клиническому применению две группы препаратов: статины и секвестранты желчных кислот [108]. Статины представляют собой преобладающую группу лекарственных средств, направленных на лечение указанных состояний и включают следующие действующие вещества и их комбинации (согласно Государственному реестру лекарственных средств РФ):

- Алирокумаб (Alirocumab\*)
- Эзетимиб (Ezetimibe\*)
- Периндоприла аргинин + Индапамид (Perindopril arginine + Indapamide\*)
- Телбивудин\* (Telbivudin)
- Верапамил + Трандолаприл\* (Verapamil + Trandolapril)
- Питавастатин\* (Pitavastatin\*)
- Дабрафениб\* (Dabrafenib\*)
- Валсартан + Сакубитрил (Valsartanum + Sacubitrilum)
- Эволокумаб (Evolocumab)

- Олапариб\* (Olaparib)
- Клофибрат\* (Clofibrate\*)
- Вориконазол\* (Voriconazole\*)
- Амлодипин + Аторвастатин\* (Amlodipine + Atorvastatin)
- Морфолиний-метил-триазалил-тиоацетат
- Метформин + Ситаглиптин\* (Metformin + Sitagliptin)
- Долутегравир\* (Dolutegravir)
- Энзалутамид\* (Enzalutamide)
- Тедизолид\* (Tedizolid)
- Ловастатин\* (Lovastatin\*)
- Симвастатин\* (Simvastatin\*)
- Флувастатин\* (Fluvastatin\*)
- Правастатин\* (Pravastatin\*)
- Аторвастатин кальций\* (Atorvastatin calcium\*)
- Церивастатин натрия\* (Cerivastatin sodium\*)
- Аторвастатин\* (Atorvastatin\*)
- Розувастатин\* (Rosuvastatin)
- Амлодипин + Лизиноприл + Розувастатин (Amlodipine + Lisinopril + Rosuvastatin)

Группа секвестрантов желчных кислот включает такие действующие вещества и их комбинации (согласно Реестру лекарственных средств РФ) как:

- Ларопипрант + Никотиновая кислота\* (Laropiprant + Nicotinic acid\*)
- Фенофибрат\* (Fenofibrate\*)
- Алендроновая кислота + Колекальциферол\* (Alendronic acid + Colecalciferol)

Комплексная терапия гиперлипидемических и гиперхолестеринемических состояний может включать применение биологически активных добавок (БАД) к пище с соответствующей потенциальной активностью. К подобным БАД, содержащих в качестве активного компонента (или в составе активных компонентов) группу полисахаридов, относятся: «Хитозан-Эвалар», «Морская капуста Оптима», «Пектин яблочный» и «Фуколам Экстра».

Среди большого многообразия средств, применяемых для коррекции атеросклероза (в первую очередь, гиперлипидемии), ведутся поиски наиболее оптимальных, безопасных, эффективных, обладающих плеiotропным, многофакторным действием [1,11,12,16,21,34].

На кафедре технологии жиров, косметики и экспертизы товаров КубГТУ в результате исследований различных растительных источников биологически активных

веществ (полиненасыщенных жирных кислот и токоферолов), разработана оригинальная рецептура БАД «Ореховая» из масел фундука и грецкого ореха. Липидкорректирующий эффект проявляется в нормализации липидного обмена разработчики БАД связывают с высокой концентрацией токоферолов с витаминной и антирадикальной активностью, а также присутствие значительных количеств олеиновой кислоты (антиатерогенный фактор) и незаменимой жирной кислоты (линолевой). [30].

Исследуется применение натуральных препаратов на основе чеснока, обладающих умеренным гиполипидемическим действием [19,21,34], и характеризующихся хорошей переносимостью, минимумом побочных эффектов и низкой стоимостью, а также обладающих плеiotропным действием. Доказаны гиполипидемические и антиатерогенные свойства чеснока [22]. Антиатерогенные свойства чеснока обусловлены его химической составляющей. Было установлено, что удаление из чеснока серосодержащих соединений, в частности органических сульфидов и особенно S-алкил-производных цистеина (важнейшим из которых является Аллиин), практически полностью лишает данный продукт его биологической активности [22]. Несмотря на то, что гиполипидемический эффект чеснока в основном объясняют его способностью ингибировать синтез ХС, доказано его прямое антиатерогенное и антиатеросклеротическое действие на толщину стенки артерии или сосуда [22].

В последние годы, значительно возрос интерес к использованию ненасыщенных жирных кислот (НЖК), особенно класса омега-3, в профилактике ССЗ, несмотря на выраженный эффект статинов, успевших себя зарекомендовать в лечении дислипидемии [23,24,25]. Согласно современным клиническим и экспериментальным исследованиям, механизм действия полиненасыщенных жирных кислот, особенно класса омега-3, сводится к ограничению всасывания пищевого ХС в тонком кишечнике, стимуляции в печени синтеза желчных кислот, торможению синтеза и секреции ХС ЛПОНП в гепатоцитах, повышают уровень ХС ЛПВП и усиливают липопротеино-липолилиз [18]. Были продемонстрированы гиполипидемические свойства оливкового, льняного и амарантового масел, содержащие в своём составе ПНЖК семейства омега-3. Все изучаемые растительные масла снижали атерогенные показатели (ОХС, ТГ, ЛПНП) и повышали антиатерогенные (ЛПВП). В работах также отмечено, что дефицит ПНЖК в питании крыс сопровождается снижением уровней ЛПВП [22].

Все производные бетулина (бетулиновая и бетулоновая кислоты, сукцинаты и ацетаты и др. эфиры органических кислот) проявляют в различной степени противоопухолевые, гиполипидемические, гепатопротекторные и противовирусные свойства [27].

Гипохолестеринемическое действие  $\beta$ -ситостерола объясняется тем, что он действует по принципу антиметаболитов, благодаря подобию химической структуры холестерина, вытесняя его при взаимодействии с ЛПНП в плазме. Другим механизмом гипохолестеринемического действия является образование достаточно стабильных комплексов  $\beta$ -ситостерола с холестерином, затрудняя всасывание их из желудочно-кишечного тракта [26].

Из полыни беловой (Artemisia leucodes Schrenk) методом углекислотной экстракции учеными АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» выделен сесквитерпеновый лактон гваянового типа леукомизин. В условиях эксперимента он продемонстрировал способность снижать уровень триацилглицеролов и холестерина в крови крыс при алиментарной гиперлипидемии [31].

В опытах на белых крысах впервые установлено гиполипидемическое действие пыльцы-обножки при «острой» и «хронической» гиперлипидемии, по эффективности приближающееся к действию официального лекарственного препарата Липанор. Установлено, что пыльца-обножка снижает интенсивность перекисного окисления липидов – уровень диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов и повышает активность антиоксидантного фермента каталазы при «острой» и «хронической» гиперлипидемии. В механизме гиполипидемического действия пыльцы-обножки основную роль играет задержка всасывания холестерина и ускорение его метаболизации в желчные кислоты, сочетающееся со снижением перекисидации и с усилением адаптивно-анаболических и мембраностабилизирующих реакций [9].

Исследования в области разработки препаратов для терапии гиперхолестеринемии ведутся в том числе с использованием различных полисахаридов.

Полисахариды являются высокомолекулярными продуктами поликонденсации моносахаридов, молекулы которых связаны друг с другом гликозидными связями [14]. К растительным относят полисахариды, биосинтезируемые низшими и высшими растениями. Среди полисахаридов низших растений наибольшее распространение получили: фукоиданы, альгинаты, каррагинан и агар-агар. Полисахаридами высших растений являются: крахмал, целлюлоза, слизи, камеди, пектины, инулин [20].

Растительные полисахариды проявляют: гепатопротекторные, антигипоксические, сорбционные, иммуномодулирующие, гиполипидемические, противовоспалительные и антиоксидантные свойства [91], оказывают противоопухолевое действие [41,94], доказано их пребиотическое действие [3]. Полисахариды нетоксичны, обладают выраженной биологической активностью и могут быть использованы при изготовлении продуктов функционального питания [8].



В настоящее время, значительный интерес вызывают гипохолестеринемические и гиполипидемические свойства некрахмальных полисахаридов [10]. Описан общепринятый механизм гипохолестеринемического действия полисахаридов: в просвете кишечника они связывают желчные кислоты, препятствуя всасыванию холестерина. В связи с повышенным выведением желчных кислот усиливается их синтез в печени, что приводит к снижению уровня холестерина в крови. Так как полисахариды слабее связывают гидрофильные желчные кислоты, в плазме крови увеличивается относительное содержание гидрофобных желчных кислот, которые сильнее, чем гидрофильные кислоты, ингибируют активность холестерин-7 $\alpha$ -гидроксилазы в печени [78].

Сульфатированные полисахариды бурых, красных и зеленых водорослей рассматриваются как перспективные средства для коррекции дислипидемий. Они характеризуются отсутствием токсичности и обладают широким спектром биологической активности, включая антидислипидемическое и антиоксидантное действие [45].

Перспективным веществом в этом отношении является фукоидан – сульфатированный полисахарид из бурой водоросли *Fucus evanescens* [4]. По химической структуре он представляет собой 1,3;1,4- $\alpha$ -L-фукан с молекулярной массой 160 кДа. В его моносахаридный состав входят фукоза, галактоза, ксилоза (соответственно 88,4; 6,0; 1,8 моль%) [95]. Фукоиданы нормализуют липидный профиль сыворотки крови, препятствуют развитию ожирения, улучшают состояние сердечнососудистой системы, обладают антигипертензивным, противовоспалительным, гепатопротекторным, иммуномодулирующим, антитоксическим, антикоагулянтным и спазмолитическим действием [39].

Согласно данным [6], полученным в ходе рандомизированного исследования на 250 добровольцах с синдромом дислипидемии в возрасте от 45 до 70 лет, прием фукоидана в дозе 100 мг в сутки на фоне базисной терапии в течение 6 месяцев достоверно снижал уровень общего холестерина, липопротеинов низкой плотности и коэффициента атерогенности. Наиболее выраженное влияние на атерогенный потенциал крови оказывала комбинированная терапия аторвастатином в дозе 10 мг с фукоиданом в дозе 100 мг (основная группа пациентов). Уже к 90 дню у всех пациентов данной группы уменьшался уровень липопротеинов низкой плотности и коэффициент атерогенности, повышался уровень липопротеинов высокой плотности, что свидетельствует об уменьшении атерогенных свойств крови. На протяжении всего срока лечения применение комбинированной терапии являлось более эффективным, чем использование аторвастатина в дозе 20 мг. Таким образом, назначение комбинации аторвастатина в дозе 10 мг и фукоидана позволяет снизить побочные эффекты статинов, при сохранении эффективности терапии.

Опубликованы результаты исследования влияния фукоидана на динамику показателей липидного обмена мышей на модели дислипидемии, индуцированной полоксамером Р-407. В условиях дислипопротеинемии выявлена способность фукоидана нормализовать основные показатели липидного обмена у мышей (уровень триглицеридов, липопротеинов высокой и очень низкой плотности в сыворотке крови) [5].

На модели алиментарной гиперлипидемии выявлена способность фукоидана при пероральном применении корректировать основные показатели липидного обмена (снижение уровня общего холестерина и его фракций низкой плотности, восстановление сниженных показателей перекисного окисления липидов), оказывать стабилизирующее действие на состояние окислительного метаболизма и активность ферментов антиоксидантной защиты, а также нормализующее влияние на анатомо-топографическую структуру печени. Гиполипидемическое действие фукоиданов, может быть обусловлено их способностью ингибировать аккумуляцию липидов путем стимуляции липолиза в клетках жировой ткани, ингибировать адипогенез и дифференцировку адипоцитов, либо стимулировать внутриклеточный транспорт липопротеинлипазы и уменьшать деградацию этого фермента в адипоцитах. Кроме того, фукоиданы связывают холестерин и желчные кислоты, участвующие в транспорте жиров из кишечника в кровь [38].

Таким образом, фукоидан является перспективным лекарственным кандидатом для разработки новых биопрепаратов с липидкорректирующим действием.

На основе полисахаридов бурой водоросли (фукоидана и альгината) была разработана биологически активная добавка к пище «Фуколам». Изучено влияние Фуколама на динамику фосфо- и нейтральных липидов в плазме крови пациентов с дислипидемией в условиях клинического эксперимента. Введение фуколама в схему лечения пациентов с дислипидемией способствует восстановлению соотношения липопротеинов плазмы крови, что обуславливает увеличение возможности выведения холестерина из мембран липопротеинами высокой плотности. Снижение доли холестерина в мембранах способствует замещению его на фосфолипидные фракции, в частности, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин [37].

Изучено влияние Фуколама на липидный обмен и уровень маркеров воспаления в крови больных ишемической болезнью сердца и дислипидемией. Комбинированное применение Фуколама с аторвастатином (10 мг/сутки) способствует нормализации уровней общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, атерогенного фактора. Отмечается снижение уровней фибриногена, С-реактивного белка и провоспалительных цитокинов [2].

Экспериментально подтверждены иммуномодулирующие свойства Фуколама на факторы врожденного и адаптивного иммунитета, сопровождающиеся снижением экспрессии активационных антигенов на лимфоцитах, нормализацией уровня IgG,

модуляцией окислительно-восстановительного потенциала и функционально-метаболических резервов нейтрофилов, сдерживанием продукции проатерогенных цитокинов. Применение Фуколама на фоне базисной терапии у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей нормализует распределение холестерина между фракциями липопротеинов и снижает гиперкоагуляционный потенциал крови [29].

Опубликованы результаты сравнительной оценки липидкорректирующего действия Фуколама индивидуально (без статина, на фоне базисной терапии) и в комбинации с разными дозами аторвастатина. У пациентов с дислипидемиями гиполипидемическое действие Фуколама на фоне базисной терапии реализуется путем постепенного снижения до уровня контроля общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, триглицеридов. Показано, что эффективность Фуколама сопоставима с эффективностью аторвастатина в суточной дозе 10 мг, что дает возможность нормализовать липидный профиль крови у пациентов с дислипидемией при помощи этого биопрепарата в тех случаях, когда статины по какой-либо причине не могут быть использованы. Результаты комбинированного применения Фуколама и аторвастатина в дозе 10 мг сопоставимы с действием одного аторвастатина в дозе 20 мг, что позволяет вдвое уменьшить дозу последнего. При этом значительно снижаются атерогенные свойства крови пациентов вследствие снижения окисленных липопротеинов низкой плотности. Аналогично аторвастатину, Фуколам улучшает состояние липидтранспортной системы крови [120].

В Японии традиционным гастрономическим блюдом считается морская водоросль *Nurpea charoides*. Установлено, что в химический состав данного растения входят полисахариды, преимущественно, альгиновая кислота и фукоидан. Эти компоненты являются доминирующими в водных извлечениях из *Nurpea charoides*. В экспериментах с использованием лабораторных крыс линии Вистар были выявлены выраженные гипохолестеринемические свойства полисахаридов *Nurpea charoides*. Отмечено снижение уровня эфиров холестерина в печени крыс, находящихся на холестериновой диете. Сопутствующим гипохолестеринемическому эффекту *Nurpea charoides* выявлен антикоагулятивный эффект водного извлечения из данного растения, изученный по соответствующим тромбоэластограммам [98].

Такие природные полисахариды как хитин и хитозан входят в число лекарственных кандидатов для борьбы с ожирением и гиперхолестеринемией. Одним из возможных механизмов такого эффекта является прямое электростатическое взаимодействие липидов и аминополисахаридов. Хитин способен связывается с липидными мицеллами (холестерином) и ингибировать их адсорбцию. Другим возможным механизмом гипохолестеринемического действия хитина и хитозана является стимулирование

выделения желчной кислоты, с которой увеличивается количество фекального жира. Кроме того, хитозан способен связывать желчные кислоты в пищеварительном тракте, снижая, при этом, их резорбцию, благодаря чему пул холестерина в организме уменьшается [99].

Гиперхолестеринемической активностью обладают и химические производные хитозана. Так, например, исследованы свойства N-арилхитозана (см. рисунок 1), полученного синтетическим путем из природного хитозана. В опытах на крысах линии Вистар установлено, что N-арилхитозан способен более чем в три раза снижать уровень общего холестерина в сыворотке крови по сравнению с контролем [88].

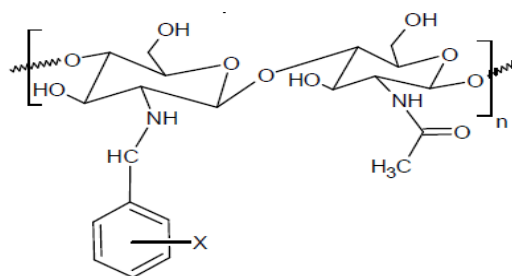


Рисунок 1 – Химическая структура N-арилхитозана

Описан гиперхолестеринемический эффект полисахаридов, выделенных из корней Лириопы колосистой (*Liriope spicata* var. *prolifera*) в опытах *in vivo* на лабораторных мышах. Химические структуры этих полисахаридов представлены на рисунке 2. Полисахариды *Liriope spicata* достоверно снижали в сыворотке крови уровни общего холестерина, липопротеинов высокой плотности, липопротеинов низкой плотности и триглицеридов [81] по сравнению с животными контрольной группы. Кроме того, доказаны противодиабетические свойства данных полисахаридов [42].

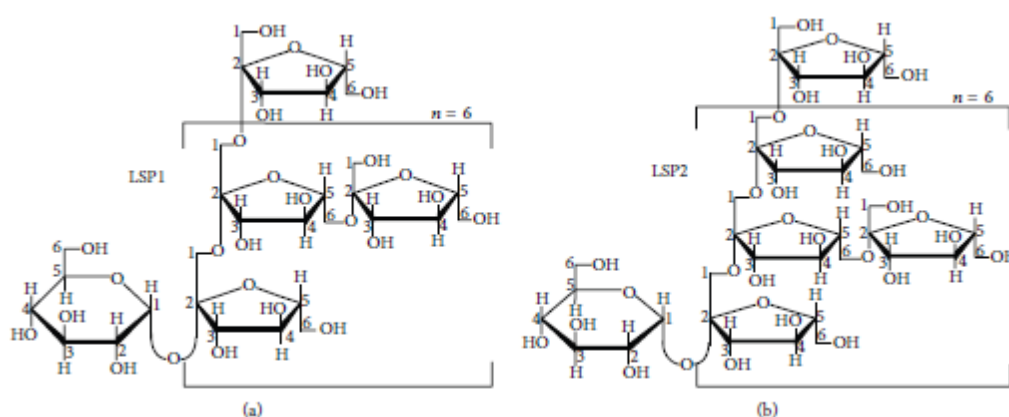


Рисунок 2 – Химические структуры полисахаридов, выделенных из корней *Liriope spicata* var. *prolifera*

Аналогичные эффекты (гипогликемический и гипохолестеринемический) исследованы для таких грибов северо-восточной Мексики как *Lentinus lepideus*, *Calvatia*

*cyathiformis* и *Ganoderma applanatum*. Водные извлечения из данных грибов продемонстрировали гипогликемическую активность, эквивалентную референтному препарату глибенкламиду, а также некоторое снижение уровня общего холестерина в сыворотке крови лабораторных крыс линии Вистар. Указанные виды активности авторы исследования связывают с наличием в химическом составе *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* и *Ganoderma applanatum* протеогликанов [67].

В сравнительном исследовании с симвастатином показано лучшее влияние полисахаридного комплекса, извлекаемого из мицелия гриба *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный), на показатели липидного обмена лабораторных мышей категории C57BL/6. Полисахаридный комплекс *Ganoderma lucidum* гораздо эффективнее референтного препарата симвастатина снижал показатели общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, триглицеридов в сыворотке крови, а также печеночного холестерина и печеночных триглицеридов. Указанные эффекты были ассоциированы с существенным уменьшением экспрессии липогенных генов (*Hmgcr*, *Srebp1c*, *Fasn*, *Acaca*) и генов, ответственных за обратный транспорт холестерина (*Abcg5*, *Abcg8*) [28]. Указанные эффекты проявляются и на модели алкогольного гепатита мышей, наряду с антиоксидантной и противовоспалительной видами активности [57].

Для полисахаридов других видов грибов *Isaria sinclairii* и *Isaria tenuipes*, относящихся к классу сордариомицетов, описаны противораковая, противовоспалительная, иммуностимулирующая, гипогликемическая, гипохолестеринемическая и антиоксидантная виды активности [53]. Кроме того, полисахариды этих грибов проявляют защитные свойства к нейрональным клеткам от свободно-радикального окисления. Исследован мономерный состав полисахаридов *Isaria sinclairii* и *Isaria tenuipes*: доминирующим компонентом является глюкоза, компонентами, содержащимися в меньших количествах, являются ксилоза, рамноза, манноза, галактоза и фруктоза [85].

Определенный интерес при разработке лекарственных средств для лечения атеросклероза и гипергликемии представляет вешенка степная (*Pleurotus eryngii*, *Pleurotaceae*) [105]. Химический состав данного гриба представлен полисахаридами, полифенолами, пептидами и пищевыми волокнами. При этом в основу водорастворимого полисахаридного комплекса входит пирановый полисахарид кислотного характера. Мономерный состав полисахаридного комплекса представлен глюкозой, маннозой и галактозой [51]. В экспериментах на лабораторных мышах с искусственно инициированным диабетом второго типа и ожирением водорастворимый полисахаридный комплекс вешенки продемонстрировал снижение уровня инсулина в плазме крови, триглицеридов в сыворотке крови, общего холестерина, липопротеинов низкой плотности и

глюкозы. При этом полисахаридный комплекс повышал уровень липопротеинов высокой плотности и содержание гликогена в печени [70].

Для другой разновидности вешенки степной (*Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*) описаны ферментативно-извлекаемые цинк-содержащие полисахариды, проявляющие гепатопротективные свойства, сочетанные с гипохолестеринемической активностью. В экспериментах на мышах доказана способность полисахаридов *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* снижать показатели щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов низкой плотности и липопротеинов очень низкой плотности. Кроме того, данные полисахариды усиливают активность антиоксидантных ферментов (SOD, GSH-Px, CAT и T-AOC), ингибируя процессы перекисного окисления липидов [62].

Карбоксиметилированные и сульфатированные полисахариды, полученные химической модификацией [43] экзополисахаридного комплекса (рисунок 3) грибов рода *Lachnum*, исследованы на гипогликемический и гиполипидемический эффекты. Полисахаридные комплексы *Lachnum* в течение четырех недель вводились мышам с индуцированным стрептозоцином диабетом второго типа и мышам, находящимся на жировом рационе [68]. Выявлена их способность к снижению уровней быстрой глюкозы на 44%, общего холестерина на 39%, триглицеридов на 44% в сыворотке крови. Кроме того, карбоксиметилированные и сульфатированные полисахариды значительно повышали экспрессию глюкокиназы и аденозинмонофосфат-активированной протеинкиназы в печени [69].

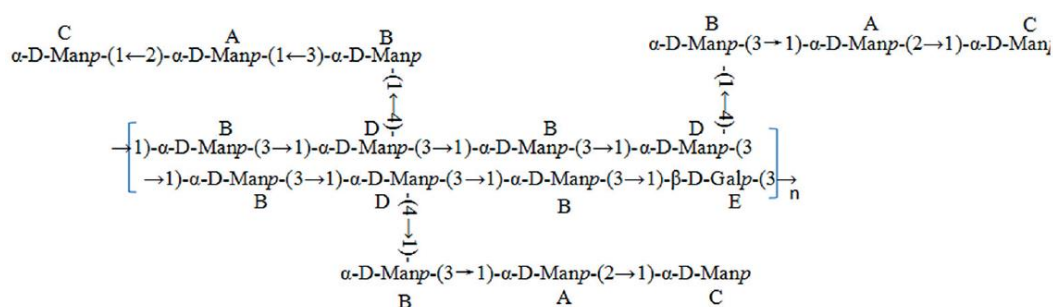


Рисунок 3 – Химическая структура повторяющегося фрагмента экзополисахаридного комплекса грибов рода *Lachnum*

В Китайской народной медицине в качестве пищевой добавки при метаболических расстройствах издавна используется *Sarcandra glabra* (Thunb.) семейства Chloranthaceae [50]. Полисахариды кислотного характера, выделенные из надземной части данного растения, продемонстрировали в экспериментах на диабетизированных стрептозоцином мышам снижение уровня глюкозы в плазме крови после приема пищи, а также снижение общего холестерина, триглицеридов и свободных жирных кислот. Авторы исследования

связывают эти эффекты со способностью полисахаридов *Sarcandra glabra* уменьшать инсулино-резистентность, стимулировать метаболизм липидов (липидный обмен), а также смягчать последствия процессов окислительного стресса [70].

Водорастворимые полисахариды, извлекаемые из корней *Salvia miltiorrhiza* (шалфей краснокорневищный, семейство Lamiaceae), проявляют кардиопротективный эффект на модели инфаркта миокарда, индуцированного изопротеренолом. Введение полисахаридного комплекса лабораторным крысам линии Вистар в течение 30 дней способствовало увеличению массы тела, снижению веса миокарда [49], снижению уровней креатинкиназы, креатина, фосфокиназы, дегидрогеназы, щелочной фосфатазы, аспартат-трансаминазы, аланинаминотрансаминазы, общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов низкой плотности, липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови [90].

Изучены гипохолестеринемические свойства пищевых волокон, входящих в состав водного извлечения из оболочек соевых семян. Установлено, что основными компонентами пищевых волокон сои являются пектиновые полисахариды. В экспериментах *in vitro* выявлена способность пектиновых полисахаридов связывать холестерин и желчные кислоты. В экспериментах *in vivo* подтвержден гипохолестеринемический эффект полисахаридов сои, выражающийся в снижении уровней общего холестерина и липопротеинов низкой плотности в сыворотке крови у крыс [100].

Гиполипидемический эффект обнаружен также и у полисахарида маннана, выделенного из культуры кандиды альбиканс (*Candida albicans*, Saccharomycetaceae) – диплоидного грибка, паразитирующего в организме человека. Вероятный механизм гиполипидемического действия маннана связан с тем, что он существенно снижает экспрессию хитотриозидазы (фермент, вырабатываемый активированными макрофагами) в печени. Это, в свою очередь, способствует снижению концентрации атерогенных липопротеинов низкой плотности, общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови, а также триглицеридов печени [40].

Другим источником маннана является красный дрожжевой рис (red yeast rice). Введение в пищевой рацион блюд, содержащим этот вид риса, является надежным профилактическим инструментом предупреждения заболеваний, связанных с повышенным уровнем холестерина [89].

Полисахариды бета-глюканы, содержащиеся в зерновых культурах, так же обладают способностью снижать уровень холестерина (липопротеинов низкой плотности) натошак и повышать уровень глюкозы в крови после приема пищи [73]. При этом на указанные свойства бета-глюкана влияют его физико-химические свойства [83], такие как

молекулярная масса и растворимость (экстрагируемость из сырья), а также вязкость пищевых продуктов после переваривания [72].

Сульфатированные полисахариды водоросли энтероморфы прорастающей (*Enteromorpha prolifera*), обитающей в странах Юго-восточной Азии, в экспериментах *in vivo* на крысах проявили протективный эффект при неалкогольной жировой болезни печени. Применение полисахаридов *Enteromorpha prolifera* приводило к значительному снижению веса печени, снижению экспрессии HMG-CoA-редуктазы и мРНК. Наблюдалось подавление стерин-связывающего белка (sterol regulatory element binding protein-2), являющегося ключевым фактором транскрипции в метаболизме холестерина и регулирующего экспрессию 3-гидрокси-3-метил-глутарил-коэнзим А редуктазы. Дополнительно отмечено, что полисахариды из водоросли *Enteromorpha prolifera* улучшают метаболизм глюкозы и снижают уровень холестерина у крыс с диабетом [96].

Полисахариды ламинарии японской (*Laminaria japonica*) проявляют гипогликемическую и гиполипидемическую активность у мышей с экспериментально индуцированным аллоксаном диабетом. При введении в течение 28 дней полисахаридного комплекса *Laminaria japonica* в различных дозах, у мышей наблюдалось снижение уровней общего холестерина, триглицеридов и липопротеинов холестерина низкой плотности, на фоне увеличения содержания липопротеинов высокой плотности. Наблюдалось предотвращение потери массы тела животных, снижение уровня глюкозы в крови натощак и увеличение уровня инсулина в сыворотке крови [87].

Сульфатированные полисахариды цимодоцеи узловатой (*Cymodocea nodosa*) изучены на ингибирующую активность липаз желудочно-кишечного тракта в условиях *in vitro* и *in vivo*. Введение полисахаридов *Cymodocea nodosa* снижает массу тела и ингибирует липазную активность крыс с индуцированным ожирением в сыворотке крови и кишечнике по сравнению с контрольными крысами. Снижение активности липазы влияет на липидный обмен: снижаются показатели общего холестерина, триглицеридов на фоне повышения уровня липопротеинов высокой плотности. Также отмечена способность полисахаридов *Cymodocea nodosa* индуцировать антиоксидантную активность путем увеличения активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [44].

Для полисахаридов момордики харанции (*Momordica charantia*, Cucurbitaceae) характерна способность к снижению рисков возникновения инфаркта миокарда. Предварительное введение крысам полисахаридов *M. Charantia* в дозах 150-300 мг/кг в течение 25 дней останавливало увеличение массы сердца (соотношение веса сердца к массе тела) и размер инфаркта. Отмечено снижение показателей аспаратаминотрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов очень низкой плотности, липопротеинов низкой плотности и липопротеинов высокой



плотности. Кроме того, полисахариды *M. Charantia* усиливали активность супероксиддисмутазы, каталазы и небелковых сульфгидрилов, снижая перекисное окисление липидов. Полисахариды *M. Charantia* снижают экспрессию противовоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли альфа, интерлейкины (IL-6, IL-10)), воспалительных маркеров (оксид азота, миелопероксидаза) и маркеры апоптоза (caspase-3, BAX). Предварительное введение крысам полисахаридов *M. Charantia* уменьшало мионекроз, отек и воспалительную клеточную инфильтрацию, а также восстанавливала кардиомиоциты [82].

Полисахаридный комплекс, выделенный из семян *Salicornia bigelovii* (Amaranthaceae) в эксперименте на крысах с индуцированной гиперхолестеринемией, проявил гиполипидемические и антиоксидантные свойства. В дозе 200 мг/кг полисахариды *Salicornia bigelovii* снижали показатели общего холестерина на 32%, липопротеинов низкой плотности на 58% и повышали уровень липопротеинов высокой плотности на 36%, что, в целом, уменьшало риск атеросклероза на 64%. Кроме того, наблюдалось снижение активности гидроксиг-3-метилглутарил-коэнзим А-редуктазы, щелочной фосфатазы, АЛТ и АСТ [66].

Таким образом, основываясь на представленных выше данных литературы, можно заключить, что полисахариды многих растительных видов, а также грибов, обладают выраженными гипохолестеринемическими и гиполипидемическими свойствами. Указанные эффекты часто сопровождаются гипогликемической, антикоагулятивной, антиоксидантной, гепатопротективной и противовоспалительной видами активности.

Растительные полисахариды являются ценными биологически активными веществами для разработки лекарственных средств, направленных на лечение метаболических заболеваний (дислипидемии, диабет, ожирение) и заболеваний сердечнососудистой системы (атеросклероз, инфаркт миокарда).

Таким образом, проведен аналитический обзор информационных источников, относящихся к разрабатываемой теме, подтверждающий, что на сегодняшний день в несмотря на наличие препаратов гиполипидемического действия, их применение в терапии может быть ограничено рядом выраженных побочных эффектов и противопоказаний. Кроме того, несмотря на огромный спрос, на рынке отсутствуют препараты, позволяющие проводить эффективную профилактику при небольших отклонениях показателей холестеринового обмена – в ситуациях, когда нет прямых показаний к назначению статинов. В связи с этим, создание новых высокоэффективных и безопасных гипохолестеринемических лекарственных средств является актуальным и востребованным направлением.

## **2. BIRCH POLYSACCHARIDES ISOLATION, DESCRIPTION AND HYPOLIPIDEMIC ACTIVITY.**

The expansion of hyperlipidemia in the world raises every year, decreasing human quality of life. According to the World Health Organization, the prevalence of cardiovascular diseases in adults  $\geq 20$  years of age is 48.0% overall (121.5 million in 2016) and increases with age in both males and females. The main damage to the human population is caused by coronary heart disease and cerebrovascular disease. Atherosclerosis is one of the main causes of cardiovascular diseases along with another risk factors as smoking, obesity, diabetes mellitus and metabolic syndrome [Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association // Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee 2020 Mar 3;141(9):e139-e596. doi: 10.1161/CIR.0000000000000757]. Hyperlipidemia causing atherosclerosis is diagnosed in 17% of the world's population [ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: the task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) / A. L. Catapano, Z. Reiner, G. De Backer et al. // Eur. Heart J. — 2011. — Vol. 32, N 14. — P. 1769–1818.].

Despite the wide arsenal of drugs used for atherosclerosis and its complications treatment, the global problem of anti-atherosclerotic therapy has not been completely solved. The investigations of new substances with lipid-lowering activity remains relevant, as well as searching for new possible molecular targets to lower the levels of atherogenic lipids.

Promising sources of lipid-lowering drugs are substances of plant origin, because they are characterized with low toxicity and a complex effect on the body [Alagumanivasagam, G. A review on medicinal plants with potential hypolipidemic activity / G. Alagumanivasagam, P. Veeramani // Int. J. Pharmacy Anal. Res. — 2015. — Vol. 4, N 2 — P. 129–134.]. The hypolipidemic and anti-atherosclerotic effect of medicinal plants is determined by the content of biologically active substances: polysaccharides, flavonoids, phospholipids, steroid saponins, hormone-like substances and enzymes [A review on promising natural agents effective on hyperlipidemia / M. Bahmani, M. Mirhoseini, H. Shirzad et al. // J. Evid. Based Compl. Altern. Med. — 2015. — Vol. 20, N 3. — P. 1569–1574.].

In the last decades, special attention has been paid to plant polysaccharides, which have a wide spectrum of pharmacological activity and, in particular, have hypolipidemic, hypoglycemic, and antioxidant effects. For example, Xiaowei Cui et al. (2018) demonstrated that the *Polygonatum sibiricum* polyaccharide complex has pronounced hypolipidemic activity [Yang, J.X .; Wu, S .; Huang, X.L .; Hu, X.Q .; Zhang, Y. Hypolipidemic Activity and Antiatherosclerotic

Effect of Polysaccharide of *Polygonatum sibiricum* in Rabbit Model and Related Cellular Mechanisms. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2015, 2015, 391065.] The mechanism of hypolipidemic effect was primarily associated with the antioxidant properties of a polysaccharide complex. It was also shown that the polysaccharide complex has a protective effect against hyperlipidemia-induced atherosclerosis in hamsters [Zhu, X .; Li, Q .; Lu, F .; Wang, H .; Yan, S .; Wang, Q .; Zhu, W. Antiatherosclerotic Potential of Rhizoma Polygonati Polysaccharide in Hyperlipidemia-induced Atherosclerotic Hamsters. *Drug Res.* 2015, 65, 479–483.]. Hypolipidemic effects of fucoidan fractions from *Saccharina sculpera* (Laminariales, Phaeophyceae) were shown by Dandan Ren et al. [Ren, D., Wang, Q., Yang, Y., Hu, Y., Song, Y., He, Y., ... & Wu, L. (2019). Hypolipidemic effects of fucoidan fractions from *Saccharina sculpera* (Laminariales, Phaeophyceae). *International journal of biological macromolecules*, 140, 188-195.]. Antioxidant and antihyperlipidemic actions were established for high sulfate purified polysaccharides from *Ulva pertusa* [Li, B., Xu, H., Wang, X., Wan, Y., Jiang, N., Qi, H., & Liu, X. (2020). Antioxidant and antihyperlipidemic activities of high sulfate content purified polysaccharide from *Ulva pertusa*. *International journal of biological macromolecules*, 146, 756-762.].

In this investigation we focused on the possible hypolipidemic activity of L-rhamnopyranosyl-6-alkyl-D-galacturonan. This polysaccharide was isolated from the birch leaves (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) using optimized method [Rovkina, K. I., Krivoshechekov, S. V., Guriev, A. M., Yusubov, M. S. ogly, & Belousov, M. V. (2019). DEVELOPMENT OF METHODS FOR OBTAINING POLYSACCHARIDES FROM BIRCH LEAVES (*BETULA PENDULA* ROTH., *BETULA PUBESCENS* EHRH.). *Chemistry of Plant Raw Material*, (3), 23-31. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019035420>].

So, the main purpose of this part of the project is an isolation of birch polysaccharides their chemical characterization and investigation lipid-lowering effects using in-vivo model of hyperlipidemia in Wistar rats.

## **2.1.Methods and materials.**

### **2.1.1. Birch polysaccharides extraction and characterization**

Birch polysaccharides was isolated from birch leaves (*Betula pendula* Roth. (*Betula verrucosa* Ehrh.) and *Betula pubescens* Ehrh, Betulaceae) with the special extraction procedure [Rovkina, K.I., Krivoshechekov, S.V., Guryev, A.M., Yusubov, M.S.O., Belousov, M.V. Development of a method of producing polysaccharides from birch leaves (*betula pendula* roth., *betula pubescens* ehrh *Chemistry of plant raw materials*. - 2019 .-- No. 3. pp 23-31]. Briefly,

sample of raw material was firstly extracted with purified water (pH = 7) at a temperature of 50 °C for 2 hours. Then, primary extract was evaporated and dissolved with 96% ethanol to the ratio 1:3. The wet residue was then dissolved in water, purified and concentrated. A solution of polysaccharides was frozen at -40 °C, dried by freeze drying at a pressure less than 0.001 atm during 2 days.

The protein impurities were determined using the Lowry method [Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 19. - P. 265–275.]. The total amount of protein in the solutions was calculated according to the calibration curve plotted for bovine serum albumin (BSA, Biosera, France). The content of uronic acids was determined by the reaction of polysaccharide with 3,5-dimethylphenol in the presence of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> using a calibration curve for D-galacturonic acid (Sigma Aldrich, USA). [Usov, A. I. Polysaccharides of algae. 48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: Isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. / A.I. Usov, M.I. Bilan, N.G. Klochkova // Botanica Marina. - 1995. - Vol. 38. - R. 43-51.]. The Fourier transform infrared (FT-IR) spectra (KBr pellets) were recorded on a FSM-1201 (Infraspec, Russia) spectrophotometer.

For monosaccharide composition analysis 5 mg of birch polysaccharides was hydrolyzed with 2 M TFA at 105 °C for 3 h in a sealed tube. The hydrolyzed sample was reduced with NaBH<sub>4</sub> and acetylated with acetic anhydride-pyridine [A.B. Blakeney, P.J. Harris, R.J. Henry, B.A. Stone, A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, Carbohydr. Res. 14 (1983) no-no.]. Then the acetylated samples were analyzed by Agilent 7820A GC equipped with flame ionization detector and a HP-5 fused silica capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm). The standard monosaccharide (glucose, xylose, galactose, rhamnose, mannose and arabinose) were prepared and subjected to GC analysis respectively in the same way. The GC analysis was performed as previously described [Pectic polysaccharides of the fresh plum *Prunus domestica* L. isolated with a simulated gastric fluid and their anti-inflammatory and antioxidant activities Author links open overlay panel Sergey V.Popov Raisa G.Ovodova Victoria V.Golovchenko Daria S.Khramova Pavel A.Markov Vasily V.Smirnov Alexandre S.Shashkov Yury S.Ovodov Food Chemistry Volume 143, 15 January 2014, Pages 106-113].

Molecular weights were determined by high performance size exclusion chromatography on a TSK-gel G-3000 PWXL column (7.8 × 300 mm, TOSOH, Tokyo, Japan) pre-calibrated by using standard pullulans (0.350 – 700.0 kDa) equipped with a Shodex RID 101 refractometric detector (Dionex, Japan).

To characterize the main carbohydrate chain and determine the nature of glycosidic bonds, <sup>13</sup>C NMR spectroscopy was used. <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 25 °C on a Bruker AVANCE III HD (400 MHz) (Germany). Sample (30 mg) was dissolved in D<sub>2</sub>O (0.5 mL).

### **2.1.2. Determination of an effective therapeutic dose of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan in healthy rats fed with standard laboratory food**

To determine the effective dose of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan studies were conducted in healthy Wistar rats. The experimental groups of animals (n=6) were given a standard laboratory diet consisted of granules with mineral and vitamin supplements for laboratory rats with the addition of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan (0.2, 1, 3, and 4.5 g/100 g of the standard diet) for 14 days. Animals of the control group (n=6) were fed with standard laboratory diet.

14 days after the start of feeding with diet containing L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan, animals of all groups were euthanized after overnight fasting. For further studies blood serum and liver samples were used. The levels of triacylglycerides (TAG) and total cholesterol (TC) were determined in the blood serum and liver tissues.

### **2.1.3. Hypolipidemic activity of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan in Wistar rats with high-fat diet induced experimental hyperlipidemia**

To study the lipid-lowering activity of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan the method of long-term (5-6 weeks) modeling hyperlipidemia was used.

The chronic hyperlipidemia was modeled in Wistar rats using a high-fat atherogenic diet providing 45% energy from animal fat (2.5% cholesterol; 0.5% cholic acid; 0.1% 2-thiouracil). Experimental animals were fed with high-fat diet for 28 days. From 29 to 42 day the experimental animals were given a high-fat diet with addition of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran (3 g/100 g of high-fat diet) or reference drug cholestyramine (2 g/100 g of high-fat diet).

At the end of the experiment blood serum and liver tissues were collected. TAG, TC, cholesterol in low density lipoproteins (LDL-C), cholesterol in high density lipoproteins (HDL-C) and total bile acids (BA) were evaluated in blood serum.

The TAG content in the blood serum was measured using the Triglycerides enzyme kit (Chronolab, Spain).

The serum TC, LDL-C and HDL-C contents were evaluated by spectrophotometric method using the Cholesterol enzyme kit, LDL Cholesterol Direct enzyme kit and HDL Cholesterol Direct enzyme kits (Chronolab, Spain), respectively, according to the attached protocol.

Serum BA were measured by an enzymatic cyclic method using the TBA kit (RANDOX, UK) as described [Zhang GH et al. An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Biochemical and biophysical research communications. 2005;326: 87–92.].

The concentrations of TAG and cholesterol in the liver tissues were evaluated after chloroform-methanol (2:1) extraction of the lipid fraction from samples according to J. Folch [FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957;226(1):497–509.] Prior to analysis, a 20% solution of Thesit detergent (Sigma-Aldrich, USA) in chloroform was added to the chloroform phase. Chloroform was removed by a stream of nitrogen; remaining lipids were dissolved in distilled water. The contents of TAG and cholesterol in extracted lipids were determined by enzymatic methods using kits (Chronolab, Spain).

#### **2.1.4. Expression of 7 $\alpha$ -hydroxylase and low-density lipoprotein receptor mRNAs in liver tissues**

CYP7A1 and Ldlr gene mRNA expression analyses were performed by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (PCR) in real time on a LightCycler® 480 amplifier (Roche, Switzerland) using TaqMan technology. mRNA from the liver was isolated by phenol-chloroform extraction using TRIzol® reagent (Invitrogen, USA). The concentration and purity of the isolated RNA was evaluated on a Nano Drop-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

Complementary DNA (cDNA) was obtained in the reverse transcription reaction using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania). The Sibenzyme kit (Russia) was used for PCR and the reactions were carried out in three replicas: preliminary denaturation - 95 °C for 5 min, denaturation - 94 °C for 15 sec, annealing at 60 °C for 10 sec, and elongation at 70 °C for 30 sec. The total number of cycles was 45. Primers and probes (FAM-BHQ1) were selected using the VectorNTI Advance 11.5 program and the NCBI database.

For the CYP7A1 gene, forward primer was 5'-CTGATGCTCTCCTGCTTTGA-3', reverse primer was 5'-CATGTAGTGGTGGCAAATTC-3' and probe was FAM-5'-TGTGGAGAGCCAAGTCAAGTGTC-3'-BHQ1. For the Ldlr gene, forward primer was 5'-GCCATCTATGAGGACAAAGTGT-3', reverse primer was 5'-

GCCACCAAATTCACATCTGA-3' and probe was FAM-5'-AGGCGGTTGGCACTGAAAATG-3'-BHQ1. Expression of each gene was expressed in arbitrary units with compared to the control group of animals and the referenced Actb enzyme (*Rattus norvegicus* actin, beta) gene (forward primer was 5'-GAAAAGATGACCCAGATCATGT-3', reverse primer was 5'-GGGACAACACAGCCTGGAT-3', probe was FAM-5'-AGACCTTCAACACCCCAGCCAT-3'-BHQ1).

Relative gene expression was evaluated by the Pfaffl method [Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.]. RNA isolated from the liver of rats fed with standard laboratory diet was used as a calibrator.

### **2.1.5. Statistical analysis.**

Methods of statistical description and statistical hypotheses testing were used to evaluate obtained data. The samples compliance with the normal distribution was checked by the Shapiro-Wilk criterion. The significance of differences in independent samples was assessed using a non-parametric test for small groups according to the Mann-Whitney test. Differences were considered as significant with the achieved significance level  $p < 0.05$ . The study results were processed using Microsoft Excel (2007), Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, USA) and SPSS Statistics17.0 (IBM, USA). Results were presented as medians (Me) and quartiles (Q1 – Q3).

## **2.2. Results and discussion**

### **2.2.1. Chemical and structural analysis of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan derived from the birch leaves**

The birch polysaccharides were extracted from the birch leaves (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) using previously described method. As the result, three separate fractions were obtained using exclusion chromatography (Figure 4).

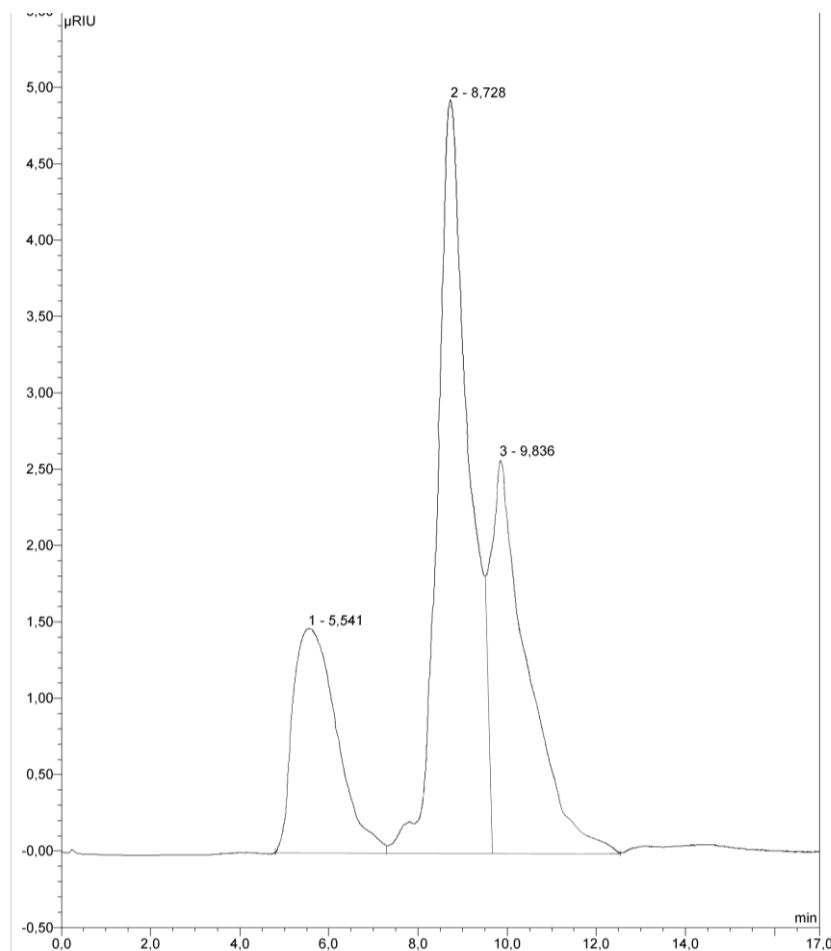


Figure 4 - Exclusion chromatogram of birch polysaccharides.

For the structural characteristics, it is necessary to establish the composition of uronic acids. Birch polysaccharides have a high uronic acid content (48.08 %). According to GC analysis, we could find that ramnose, arabinose, galactose constituted neutral monosaccharides in these polysaccharides. The yield of ramnose could reach up to 30.56 % after hydrolysis, which suggested that presence of rhamogalacturonan I in birch polysaccharides. The content of galactose and arabinose did not exceed 5.5 and 14.0%, respectively. Based on the calibration with standard pullulans, the average molecular weight of birch polysaccharides was estimated to be about 350.0 kDa, while the crude polysaccharides had a heterogeneous elution profile  $M_w / M_n = 20.91$  (Fig.4). The protein impurity content was  $1.24 \pm 0.05\%$ .



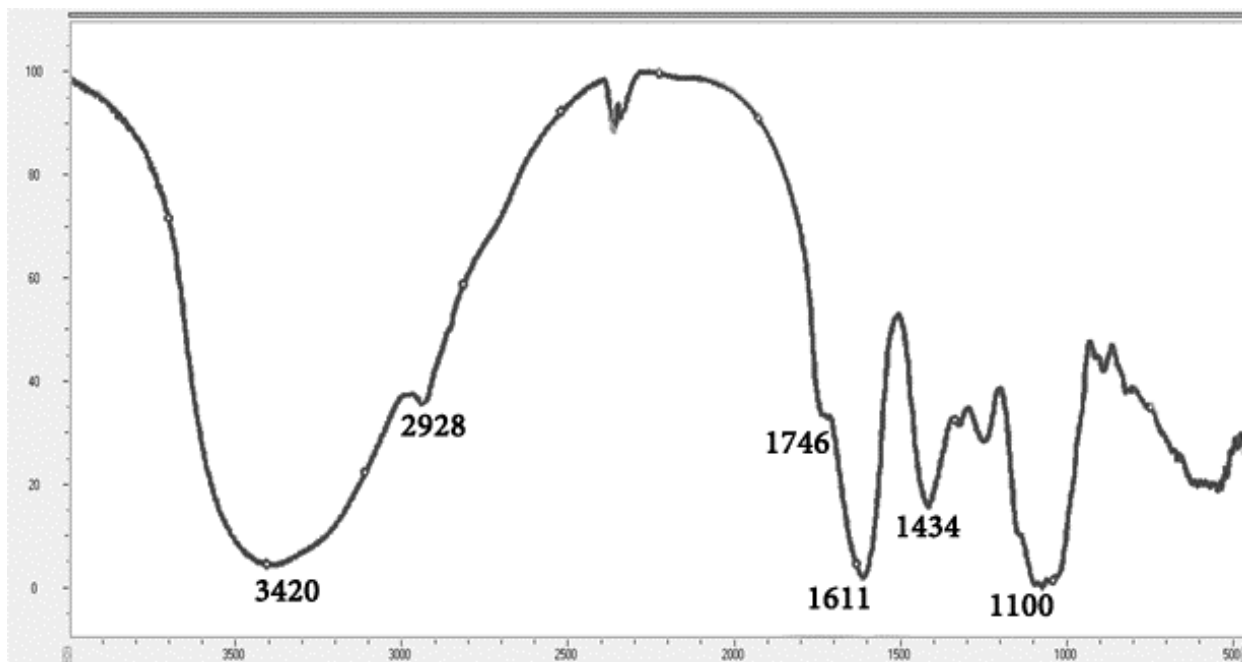


Figure 5 - Infrared spectrum of birch polysaccharide

The infrared spectrum of pumpkin polysaccharide was shown in Fig. 5, which had a typical characteristic absorption peak. In the glycosidic bond stretching range  $1100\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  characteristic FTIR bands around  $1100\text{ cm}^{-1}$  associated with the glycosidic bridges (C-O-C bonds). There was a broad peak at  $3420\text{ cm}^{-1}$ , which was the O-H stretching vibration and absorption peak caused by the bending vibration of O-H at  $1611\text{ cm}^{-1}$ . The broad bands  $1760\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$  and  $1650\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$  originate from vibration of esterified and nonesterified groups in polysaccharides. On the IR spectrum of birch polysaccharides in the region  $1760\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ , which corresponds to the appearance of a strip of esterified groups in pectin, a low but noticeable peak is present, indicating a low degree of methyl etherification. Absorption band at  $2928\text{ cm}^{-1}$  corresponds to stretching vibrations of C-H bonds and absorption peak of C-O was at  $1746\text{ cm}^{-1}$ . The absorption peak at  $1434\text{ cm}^{-1}$  caused by the C-O stretching vibration of carboxyl group.

Partial acid hydrolysis was used to isolate the main carbohydrate chain. For this, 50 mg of birch polysaccharide in a sealed tube was hydrolyzed with 10 ml of 0.1 M TFA at  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 hour. To characterize the main carbohydrate chain and determine the nature of glycoside bonds,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy was used (Figure 6).

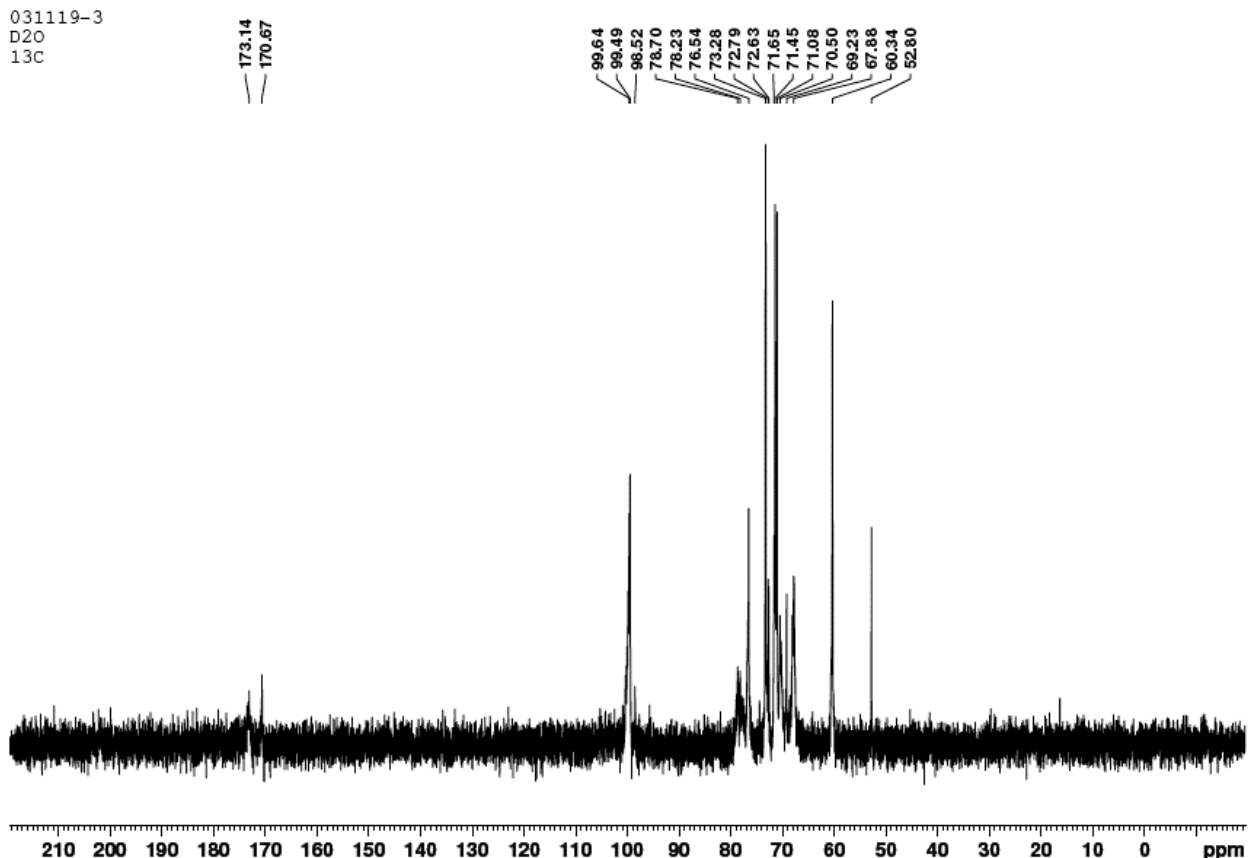


Figure 6 -  $^{13}\text{C}$  – NMR spectrum of the PSfB-3E2 fragment

In the anomeric regions of the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the polysaccharide, broadened signals of various intensities were present. Four main signals of rhamnopyranosyl and galacturonopyranosyl residues were detected. Two intense signals at 99.65 and 98.5 in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of the anomeric region were identified as the corresponding 2-O-substituted rhamnopyranosyl residues and 4-O-substituted galacturonopyranosyl residues [Renard, C.M. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp / C.M. Renard, M. Lahaye, M. Mutter, F.G. Voragen, J. Thibault // *Carbohydr. Res.* – 1998. – Vol.305. – P. 271-280.; do Nascimento, G.E. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity / G.E. do Nascimento, C.R. Corso, M.F. Paula Werner, C.H. Baggio, M. Iacomini, L.M.C. Cordeiro // *Carbohydrate Polymers.* – 2015. – Vol.116. – P. 300-306.]. Other areas include COOH signals at  $\delta\text{C}$  173.14 ppm and COOCH<sub>3</sub> 170.67 ppm. In addition, an intense methoxy carbon signal (COOCH<sub>3</sub>) was detected at  $\delta\text{C}$  52.8ppm [Ralet, M.-C. Thibault Mapping sugar beet pectin acetylation pattern / M.-C. Ralet, J.C. Cabrera, E. Bonnin, B. Quémener, P. Hell  n, J.-F. Thibault // *Phytochemistry.* – 2005. – Vol.66. – P. 1832-1843.; Lerouge, P. Albersheim Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan / P. Lerouge, M.A. O'Neill, A.G. Darvill, P. Albersheim // *Carbohydr. Res.* – 1993. – Vol.243. – P. 359-371].

Thus, according to the  $^{13}\text{NMR}$  spectrum of a representative polysaccharide fragment, its main carbohydrate chain is represented by L-ramnopyranosyl-6-alkyl-D-galacturonan.

### **2.2.2. Determination of an effective therapeutic dose of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan**

As a result of experiments, it was found that in the blood serum of animals treated with L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan for 14 days at a dose of 0.2 g/100 g of the standard diet, the TC and TAG contents did not significantly differ from the control group (Table 3). At a dose of 1g/100g of the standard diet and 3g/100g of the standard diet, L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan showed a dose-dependent lipid-lowering effect.

With an increase in the L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran dose up to 4.5 g/100 g of the standard diet, there was no further decreasing in the TC level in the blood serum of experimental animals. In doses of 3 and 4.5 g/100g of the standard diet, L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan reduced the serum TAG content comparing to the values of the control group of animals. At the same time, there were no significant differences in the TAG content between these groups.

L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan did not affect the cholesterol and TAG content in the liver at a dose of 0.2 g/100 g of the standard diet (Table 4). At the doses 3 and 4.5 g/100 g of the standard diet, the content of cholesterol and TAG in the liver was decreased comparing the control group of rats (Table 4). However, increasing the dose of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan up to 4.5 g/100 g of the standard diet was not accompanied by a significant decrease in cholesterol and TAG content in rat liver in comparison with the group of animals fed with diet containing polysaccharide at a dose of 3g/100g of the standard diet.

### **2.2.3. Hypolipidemic effects of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan on the model of hyperlipidemia in Wistar rats**

The specific activity study in the L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran in high-fat diet model in rats has showed that the polysaccharide has a hypolipidemic effect. The polysaccharides addition to the high-fat diet has led to the decrease in TAG and TC levels in rats comparable with the reference drug cholestyramine.

L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran at a dose of 3g / 100 g of high-fat diet when fed for 14 days contributed to a decrease in the level of TAG in blood serum by 49.8% (1.64 (1.11–2, 41) mmol/l). The reference drug cholestyramine at a dose of 2g / 100 g of high-fat diet - by 56.8% (1.41 (1.18–2.21) mmol/l) ( $p < 0.05$ ).

A significant increase in TC level in the blood serum of animals treated with an atherogenic diet for 6 weeks was observed (16.06 (13.05–25.43) mmol/l), which is 8 times more than in rats fed with standard laboratory diet (2.01 (1.04–2.24) mmol/l). Administration of 3g / 100 g of high-fat diet L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran in this experiment resulted in the decrease of TC content by 34.1% ( $p<0.05$ ), so, its level was 10.59 (9.00–11.35) mmol/l. The reference drug cholestyramine at a dose of 2g / 100 g of high-fat diet reduced the TC content in the blood serum by 39.4% ( $p<0.05$ ).

The blood serum TC decreasing in rats fed with a high-fat diet and addition L-rhamnopyranosyl-6-alkyl-d-galacturonan (3 g / 100 g of high-fat diet) was largely connected with the atherogenic LDL-C fraction reduction (Table 6).

It is known that cholesterol is localized in serum mainly in fractions of very low-density lipoproteins (VLDL-C), LDL-C and HDL-C. Moreover, a high level of cholesterol in LDL-C promotes the development of atherosclerosis. In rats, cholesterol in the blood serum is predominantly in the HDL-C fraction.

The increase in the level of TC in rat blood serum on the background of an atherogenic diet is mainly due to the LDL-C fraction (cholesterol content was increased for 11.4 times ( $p<0.05$ ) (Table 6)). The cholesterol content in rats fed with a high-fat diet was increased for 4.1 times ( $p<0.05$ ). L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran reduced the content of LDL-C level in the blood serum by 42% ( $p<0.05$ ) and HDL-C level by 34.1% ( $p<0.05$ ). Cholestyramine reduced the LDL-C content by 46.2% ( $p<0.01$ ) and HDL-C content by 39.4% ( $p<0.01$ ).

In addition, L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran decreased levels of TAG and cholesterol in the liver tissues of rats fed with a high-fat diet.

The high-fat diet led to an increase in the TAG content in liver up to 4.1 times (26.92 (21.99–29.08) mg/g ( $p<0.05$ )) due to the increased level of free fatty acids circulating in the blood, which are captured by the liver and used for the TAG synthesis. L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran reduced the TAG content in the liver by 30.5%, cholestyramine - by 25.6% ( $p<0.05$ ). Feeding animals with a high-fat diet containing 2.5% cholesterol, 0.5% cholic acid and 0.1% 2-thiouracil for 6 weeks led to a significant increase in cholesterol content in the liver of rats (64.05 (51.59–71.22) mg/g of liver), which is 25.2 times ( $p<0.05$ ) higher than the cholesterol level in the liver of rats fed with standard laboratory diet (6.50 (5.29–7.40) mg/g). The polysaccharide at a dose 3g / 100g of high-fat diet reduced the cholesterol content in the liver of experimental animals by 32.6%. Cholestyramine at a dose 2 g / 100 g of high-fat diet reduced this parameter by 39.6% ( $p<0.05$ ).

As a result of the experiments, it was found that the BA content in the blood serum of rats fed with high-fat diet increased up to 1.9 times ( $p < 0.05$ ) due to the fact that BA during digestion are excreted into the intestine, most of them are then absorbed and returned into the liver through enterohepatic circulation. In the model of chronic hyperlipidemia induced by a high-fat diet containing cholesterol, cholic acid is been an essential component of the diet. Cholic acid promotes the cholesterol and fat absorption and inhibits the formation of BA from cholesterol in the liver, which leads to hypercholesterolemia [Opyd PM, Jurgoński A, Juśkiewicz J, Fotschki B, Koza J. Comparative Effects of Native and Defatted Flaxseeds on Intestinal Enzyme Activity and Lipid Metabolism in Rats Fed a High-Fat Diet Containing Cholic Acid. *Nutrients*. 2018;10(9):1181. Published 2018 Aug 28. doi:10.3390/nu10091181].

L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran at a dose 3 g / 100 g of high-fat diet and the reference drug cholestyramine (2 g / 100 g of high-fat diet) reduced the BA content in rats with high-fat diet induced experimental hyperlipidemia by 37.8% ( $p < 0, 05$ ) and 42.3% ( $p < 0, 05$ ), respectively.

It can be suggested that the mechanism of lipid-lowering action of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran includes the ability to bind BA in the intestine, preventing their reabsorption. As the pool of bile acids is depleted, the activity of 7- $\alpha$ -hydroxylase in the liver increases, which increases the conversion of cholesterol to bile acids. This leads to an increase in atherogenic low-density lipoproteins clearance and furthermore a decrease in the content of LDL-C in the blood serum [Li T, Chiang JY. Bile acids as metabolic regulators. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31(2):159–165. doi:10.1097/MOG.0000000000000156; Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009;50(10):1955–1966. doi:10.1194/jlr.R900010-JLR200].

#### **2.2.4. The influence of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran on the CYP7A1 and Ldlr liver mRNA expression in rats with high-fat diet induced experimental hyperlipidemia**

It was found that, in the liver of rats with high-fat diet induced experimental hyperlipidemia the mRNA expression of the 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) and low-density lipoprotein receptor (Ldlr) genes decreases (0.55 (0.42–0.64) and 0,64 (0.51–0.81) conv. units, respectively). The decrease in the BA content in bile of animals fed with high-fat diet is due to a low expression of CYP7A1 mRNA. The increased level of LDL-C in the blood serum is associated with a decrease in the LDL receptors (Ldlr) mRNA expression, which is involved in the circulating low-density lipoproteins absorption by hepatocytes [Zhang M, Xie Z, Gao W, Pu L, Wei J, Guo C. Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-

bile acid conversion and cholesterol efflux in rats. *Nutr Res.* 2016;36(3):271–279. doi:10.1016/j.nutres.2015.11.019].

L-ramnopyranosyl-6-O-methyl-d-galacturonan (3g / 100g of high-fat diet) administration leads to the 2.4 times increase in the CYP7A1 mRNA expression ( $p < 0.05$ ), and to the 1.7 times increase in the Ldlr mRNA expression ( $p < 0.05$ ). The including of cholestyramine into the high-fat diet also increased the expression of CYP7A1 and Ldlr mRNAs by 2.9 ( $p < 0.05$ ) times and 2.0 ( $p < 0.05$ ) times, respectively (Table 1).

Table 1 – The influence of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran and cholesteramine on the CYP7A1 (7 $\alpha$ -hydroxylase) and Ldlr (low-density lipoprotein receptor) liver mRNA expression in rats with high-fat diet induced experimental hyperlipidemia. Values are expressed as Me (Q1-Q3), p.

Experimental groups	CYP7A1 mRNA expression, conv. units	Ldlr mRNA expression, conv. units
1. Control group	0,98 (0,92–1,11)	0,94 (0,92–1,14)
2. High-fat diet group	0,55 (0,42–0,64) $p_{2-1} < 0,01$	0,64 (0,51–0,81) $p_{2-1} < 0,01$
3. High-fat diet + L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran (3 g/100 g of high-fat diet)	2,35 (2,20–2,73) $p_{3-1} < 0,01$ $p_{3-2} < 0,01$	1,67 (1,34–1,96) $p_{3-1} < 0,01$ $p_{3-2} < 0,01$
4. High-fat diet + cholestyramine (2 g/100 g of high-fat diet)	2,89 (2,64–2,90) $p_{4-1} < 0,01$ $p_{4-2} < 0,01$	2,03 (1,93–2,35) $p_{4-1} < 0,01$ $p_{4-2} < 0,01$

It was previously shown that cholesterol accumulation in the liver increases the expression of CYP7A1 mRNA and, to a lesser extent, the expression of Ldlr mRNA [Shibata S, Hayakawa K, Egashira Y, Sanada H. Roles of nuclear receptors in the up-regulation of hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase by cholestyramine in rats. *Life Sci.* 2007;80(6):546–553. doi:10.1016/j.lfs.2006.10.003].

Thus, an increase in the CYP7A1 mRNA expression in the liver indicates an increased elimination of cholesterol in the form of BA. The L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran lipid-lowering action is connected with its BA-binding ability. BA binding in the intestine leads to its exclusion from the enterohepatic circulation. It provides the decrease of BA content in hepatocytes accompanied by increase in the CYP7A1 mRNA expression and finally contributes to an increased cholesterol elimination in the form of BA bound by L-ramnopyranosyl-6-alkyl-

d-galactouran in the intestine with feces. Increased expression of the Ldlr mRNA leads to the increased uptake of atherogenic lipoproteins from the blood and decreased cholesterol serum levels.

### **Conclusion**

The specific activity study of L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran in high-fat diet model in Wistar rats has showed that the polysaccharide has a hypolipidemic effect. The L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran addition to the high-fat diet leads to the decrease in TAG and TC levels in rats comparable with the reference drug cholestyramine. The serum TC decreasing in rats fed with a high-fat diet is largely connected with the atherogenic LDL-C fraction reduction. In addition, L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran promotes decrease in liver TAG and liver cholesterol levels in rats fed with a high-fat diet. L-ramnopyranosyl-6-alkyl-d-galactouran lipid-lowering action is connected with its BA-binding ability. Sequestrant drugs are widely used in the combinatory anti-hyperlipidemic therapy with HMG-CoA reductase inhibitors (statins) or cholesterol intestinal transporter inhibitor (ezetimibe).

### **3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ БЕРЕЗЫ**

#### **3.1 Материалы и методы исследования**

При разработке лабораторной технологии получения фармацевтической субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана (далее – ФС) использовали следующие материалы и оборудование:

##### ***Используемые материалы и сырье:***

1. Листья березы. Производитель ЗАО «Здоровье», серия 140517,
2. Спирт этиловый медицинский, 95%. (ЗАО «Кемеровская фармацевтическая фарбрика»).
3. Колба мерная 1000 мл.
4. Цилиндр мерный 250 мл.
5. Воронка стеклянная.
6. Стакан химический 600, 250 и 50 мл,
7. Фильтры бумажные, марлевые.

##### ***Используемое оборудование***

1. Весы электронные AND HL-400, HR-200.
2. Центрифуга многофункциональная Eppendorf 5702.
3. Роторный испаритель Heidolph Hei-VAP Advantage.
4. Термостат лабораторный BSU-100 MLW.
5. Мешалка магнитная IKA C-MAG HS7.
6. Дозатор одноканальный Thermo Scientific 500-5000 мкл,
7. Аналитическая хроматографическая система Ultimate 3000 DIONEX Ultimate 3000 с УФ-спектрометрическим детектором.
8. Комплекс UltiMate 3000 производства компании Dionex.
9. Влагомер AND MX-50.
10. Вискозиметр Fungilab Premium, УЗ-ванна Elmasonic P70H.

#### **3.2. Разработка технологической схемы**

L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронан является веществом полисахаридной природы. Наиболее распространенным способом выделения полисахаридов из растительного сырья является экстракция водным растворителем (в большинстве случаев, подкисленным хлористоводородной кислотой до pH=2-6) при нагревании, с последующим сгущением экстракта и спиртовым осаждением. Перед проведением спиртового осаждения целесообразно провести очистку экстракта от остаточных твердых частиц сырья. В



процессе осаждения вместе с полисахаридом могут осаждаться низкомолекулярные примеси (НМП), поэтому необходима стадия очистки продукта от НМП. Сушка также является значимой стадией при получении полисахаридов т.к. параметры высушивания могут существенно влиять на морфологию конечного продукта.

Таблица 2 – Обоснование выбора оборудования для получения субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Название оборудования	Обоснование
Сита диаметром 2 и 5 мм	Необходимы для отделения нужной фракции сырья от пыли и крупных включений.
Весы электронные	Позволяют отбирать нужное количество сырья.
Центрифуга	Позволяет отделить экстракт от частиц неотфильтрованного сырья на стадии получения фармацевтической субстанции.
Реактор	Необходим для проведения проведения экстракции фармацевтической субстанции.
Роторный испаритель	Позволяет концентрировать извлечение на стадии получения экстракта, а так же проводить очистку фармацевтической субстанции.
Система Бунзена-Бюхнера	Предназначена для осуществления фильтрации на стадиях получения и очистки фармацевтической субстанции.
Лиофильная сушка	Позволяет высушивать фармацевтическую субстанцию после получения.
Термостат лабораторный	Необходим для определения мтепени влияния конвективной сушки на качество готового продукта
Дозатор одноканальный	Необходим для точного отмеривания объемов используемых растворителей
Мешалка магнитная	Необходима для непрерывного перемешивания экстракционной смеси
Влагомер	Позволяет определять влажность анализируемых образцов
Вискозиметр	Необходим для определения динамической вязкости анализируемых образцов.

Таким образом, для выделения L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана из листьев березы была использована предварительная технологическая схема, состоящая из следующих основных стадий:

1. экстракция,
2. упаривание экстракта,
3. центрифугирование,
4. спиртовое осаждение,
5. очистка от НМП,
6. сушка конечного продукта.

Исходя из предложенной технологической схемы, предварительная лабораторная технология получения фармацевтической субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана выглядит следующим образом:

#### 1. Экстракция

Навеску измельченных листьев березы (рисунок 1) массой 10 г смешивают в стеклянной колбе с 400 мл воды очищенной, подкисленной кислотой хлористоводородной до  $\text{pH}=4,0$  (соотношение сырье:экстрагент 1:10), и нагревают на водяной бане при температуре  $90^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов. Полученный водный экстракт отфильтровывают через тканевый фильтр. Шрот переносят с фильтра в стеклянную колбу и повторно заливают 400 мл воды очищенной, подкисленной кислотой хлористоводородной до  $\text{pH}=4,0$ , нагревают на водяной бане при температуре  $90^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов и фильтруют через тканевый фильтр. После этого шрот отбрасывают. Полученные извлечения объединяют и передают на стадию упаривания.

#### 2. Упаривание экстракта

Полученный экстракт упаривают на роторном испарителе при температуре  $50^{\circ}\text{C}$  и давлении 25 мбар до 100 мл.

#### 3. Центрифугирование

Упаренный экстракт центрифугируют в течение 10 минут, при 4400 об/мин., для удаления оставшихся частиц сырья. Супернатант отделяют от осадка методом декантирования.

#### 4. Спиртовое осаждение

К полученному густому экстракту медленно при перемешивании прибавляют этанол в соотношении экстракт:этанол 1:2. Смесь оставляют в холодильнике на 60 мин. Выпавший хлопьевидный осадок отфильтровывают под вакуумом через фильтр с помощью системы Бунзена-Бюхнера.

#### 5. Очистка от низкомолекулярных примесей

Полученный полупродукт переносят с фильтра в стеклянную колбу, добавляют 200 мл 96% этанола и нагревают в течение 1 часа при постоянном перемешивании и температуре бани  $85^{\circ}\text{C}$ . Затем этанольный раствор отфильтровывают через бумажный фильтр, используя систему Бунзена-Бюхнера. Собирают осадок на фильтре и проводят его повторную очистку.

#### 6. Сушка конечного продукта.

Полученный полупродукт переносят с фильтра в емкость для сушки и высушивают в подходящих условиях до постоянной массы.

Для разработки лабораторной технологии получения фармацевтической субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана необходимо определить оптимальные параметры на каждой стадии технологического процесса. Для этого было проведено

изучение влияния технологических параметров на выход и показатели качества конечного продукта в процессе его получения.

### **3.3. Влияние технологических параметров на выход и показатели качества фармацевтической субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана**

Для определения влияния технологических параметров на выход и показатели качества конечного продукта был проведен ряд экспериментов, в каждом из которых изменялся только один технологический параметр. Для оценки влияния технологических параметров на изменение качественных либо количественных показателей качества фармацевтической субстанции проводили однофакторный дисперсионный анализ для каждого эксперимента.

В качестве критериев для оценки влияния исследуемых параметров использовали:

1. Выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана (% от количества исходного растительного сырья) – экономический показатель, обуславливающий рациональность технологического подхода и конечную себестоимость готового продукта.
2. Динамическую вязкость (мПа\*с) 1,5% раствора полученных образцов L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана в 1% водном растворе уксусной кислоты. Динамическая вязкость – показатель качества субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, характеризующий степень полимеризации (молекулярную массу) полисахарида и степень очистки от низкомолекулярных примесей (см. раздел Разработка методик анализа ФС и их валидация).

#### **3.3.1 Определение оптимальных параметров экстрагирования L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана из растительного сырья (стадия экстракции)**

3.3.1.1 Изучение влияния pH экстрагента на выход и качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Использование подкисленного экстрагента для выделения L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана из листьев березы обусловлено природой действующего вещества. Известно, что в растительном сырье полисахариды могут находиться в связанном виде (например, с ионами двухвалентных металлов) и не полностью извлекаться при экстракции нейтральным растворителем. Для повышения растворимости кислых полисахаридов используется подкисление экстрагента, например, добавление хлористоводородной кислоты, слабые концентрации которой способствуют разрушению солей кислых галактуронанов и переходу их в растворенное состояние. Однако, наличие сложноэфирных связей в полимерных звеньях галактуроновой кислоты, в случае L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, резко снижает кислотные свойства и способность полисахарида к

связыванию с ионами двухвалентных металлов во внутриклеточном матриксе, что оказывает существенное влияние на динамику его извлечения из растительного сырья в зависимости от pH экстрагента.

Для подбора оптимального значения pH экстрагента было исследовано влияние экстрагента с различным pH на выход и динамическую вязкость раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана. В качестве экстрагента использовали воду очищенную, подкисленную хлористоводородной кислотой до значения pH 2,0; 4,0; 6,0 и воду очищенную без добавления хлористоводородной кислоты pH 7,0. Эксперимент повторяли 3 раза. Результаты эксперимента представлены в таблице 3. Графическое отражение полученных результатов представлено на рисунке 7.

Таблица 3. – Результаты эксперимента по изучению влияния pH экстрагента на выход и динамическую вязкость L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Значение pH экстрагента	Выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, %	Динамическая вязкость 1,5% раствора, мПа*с
2,0	2,91; 2,85; 2,77	26,9; 26,9; 27,1
4,0	2,89; 2,95; 2,99	27,0; 27,1; 27,1
6,0	2,96; 2,85; 2,91	29,0; 29,2; 28,9
7,0	2,90; 2,90; 2,91	30,4; 30,6; 30,7

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 3а.

Таблица 3а – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния pH экстрагента на выход и динамическую вязкость L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана						
рН экстрагента		Число степеней свободы		Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия
2,0		2		8,53	2,843333	0,004933
4,0		2		8,83	2,943333	0,002533
6,0		2		8,72	2,906667	0,003033
7,0		2		8,71	2,903333	3,34*10 <sup>-5</sup>
Динамическая вязкость раствора						
2,0		2		80,9	26,96667	0,013333
4,0		2		81,2	27,06667	0,003333
6,0		2		87,1	29,03333	0,023333
7,0		2		91,7	30,56667	0,023333
Дисперсионный анализ (по выходу)						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между	0,015425	3	0,005142	1,95	0,199803	4,066181

группами						
Внутри групп	0,021067	8	0,002633	-	-	-
Итого	0,036492	11	-	-	-	-
<b>Дисперсионный анализ (по динамической вязкости)</b>						
Между группами	26,7825	3	8,9275	563,84	$1,21 \cdot 10^{-9}$	4,066181
Внутри групп	0,126667	8	0,01584	-	-	-
Итого	26,90917	11	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения для данных по выходу L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана больше 0,05, следовательно, критерий Фишера не значим, и влияние значения рН экстрагента на выход продукта не является значимым фактором.

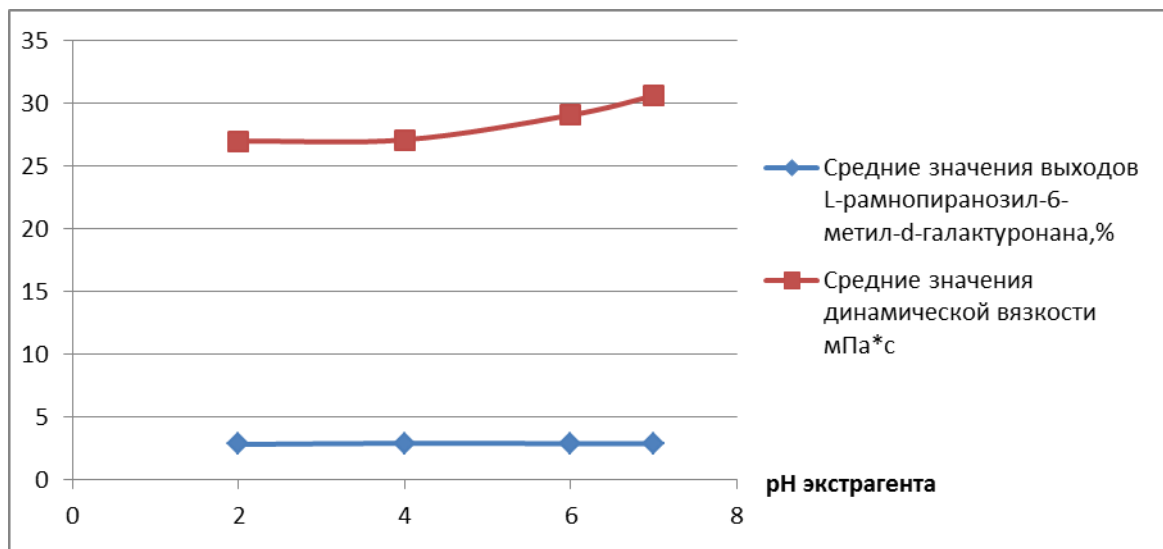


Рисунок 7 - График зависимости основных параметров эксперимента от величины значения рН

Для данных по динамической вязкости величина значения  $p$  меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние значения рН экстрагента на показатель качества субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана является значимым фактором.

Образцы, полученные с использованием экстрагента с рН 2, 4 и 6 не соответствовали установленным значениям динамической вязкости. Удовлетворительным значением данного показателя характеризовались образцы, полученные экстракцией растворителем со значением рН = 7,0.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что значение рН экстрагента не оказывает существенного влияния на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, но влияет на его качество — оптимальным является использование экстрагента с рН = 7,0.

### 3.3.1.2 Изучение влияния соотношения сырье:экстрагент на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

При экстракции растительного сырья (рисунок 8), соотношение сырье:экстрагент оказывает существенное влияние на выход готового продукта и в меньшей степени влияет на его качественные характеристики. В связи с этим был проведен эксперимент по изучению влияния различных соотношений экстрагента (воды очищенной pH=7) и растительного сырья (листьев березы) на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана. В эксперименте были исследованы следующие значения соотношений сырье:экстрагент: 1:10; 1:20; 1:30; 1:40. Эксперимент повторяли 3 раза. Результаты эксперимента приведены в таблице 4. Графическое отражение полученных результатов представлено на рисунке 9.



Рисунок 8- Процесс экстракции растительного сырья

Таблица 4 – Результаты эксперимента по изучению влияния соотношения сырье:экстрагент на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Соотношение сырье:экстрагент	Выход L- рамнопиранозил-6-О- метил-d-галактуронана , %		
	1	2	3
1:10	1,70	1,65	1,68
1:20	2,87	2,90	2,91
1:30	2,91	2,88	2,90
1:40	2,88	2,84	2,85

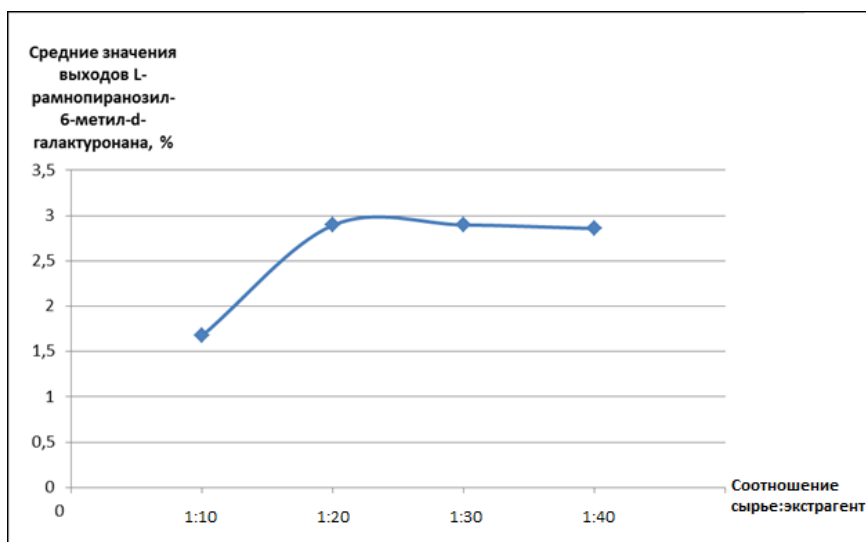


Рисунок 9 – График зависимости выхода L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана от соотношения сырье:экстрагент

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 5.

Таблица 5 – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния соотношения сырье:экстрагент на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Соотношение сырье:экстрагент	Число степеней свободы	Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия		
1:10	2	5,03	1,676667	0,000633		
1:20	2	8,68	2,893333	0,000433		
1:30	2	8,69	2,896667	0,000233		
1:40	2	8,57	2,856667	0,000433		
Дисперсионный анализ						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F-критическое
Между группами	3,273025	3	1,091008	2517,712	3,08*10 <sup>-12</sup>	4,066181
Внутри групп	0,003467	8	0,000433	-	-	-
Итого	0,7225	11	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние соотношения сырье:экстрагент на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана можно считать доказанным.

Из результатов эксперимента видно, что при соотношениях сырье:экстрагент 1:20; 1:30 и 1:40 не наблюдается значимых различий в выходе конечного продукта, при

использовании 10 частей экстрагента к 1 части сырья, наблюдается достоверное снижение выхода L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана. Использование соотношений сырье:экстрагент 1:30 и 1:40 является нецелесообразным, так как не приводит к достоверному увеличению выхода продукта, но ведет к усложнению технологии, связанному с упариванием большего количества растворителя, на последующих стадиях технологического процесса.

Таким образом, оптимальное соотношение сырье:экстрагент используемое для получения субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана – 1:20.

### 3.3.1.3 Изучение влияния температурного режима экстракции на выход и качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Температурный режим экстракции может оказывать существенное влияние на выход и качество конечного продукта. Изменение температуры в ту или иную сторону может повлечь за собой как увеличение выхода продукта, так и его снижение, за счет разрушения полисахарида при высоких температурах. Влияние температурного режима экстракции на выход и качество L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана было исследовано экспериментально. Для этого было проведено сравнение этих показателей у образцов L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, полученных экстракцией листьев березы водой очищенной (рН=7), соотношении сырье:экстрагент 1:20, при температуре 50<sup>0</sup>С, 90<sup>0</sup>С и комнатной температуре (22<sup>0</sup>С).

В качестве параметров для оценки использовали выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана и динамическую вязкость его 1,5% раствора. Эксперимент повторяли 3 раза. Результаты эксперимента приведены в таблице 6.

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 7.

Таблица 6 – Результаты эксперимента по изучению влияния температурного режима экстракции на выход и динамическую вязкость L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Температура экстракции, <sup>0</sup> С	Выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, %			Динамическая вязкость 1,5% раствора, мПа*с		
	1	2	3	1	2	3
22	1,75	1,78	1,79	25,9	25,6	25,4
50	3,21	3,17	3,20	30,5	30,4	30,2
90	2,90	2,87	2,89	30,2	30,0	30,1



Таблица 7 – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния температурного режима экстракции на выход и динамическую вязкость L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Выход						
Температура экстракции	Число степеней свободы		Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия	
22	2		5,32	1,773333	0,000433	
50	2		9,58	3,193333	0,000433	
90	2		8,66	2,886667	0,000233	
Динамическая вязкость						
22	2		76,9	25,63333	0,063333	
50	2		91,1	30,36667	0,023333	
90	2		90,3	30,1	0,01	
Дисперсионный анализ (по выходу)						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	3,349956	2	1,674978	4568,121	$2,83 \cdot 10^{-10}$	5,143253
Внутри групп	0,0022	6	0,000367	-	-	-
Итого	3,352156	8	-	-	-	-
Дисперсионный анализ (по динамической вязкости)						
Между группами	42,42667	2	21,21333	658,3448	$9,33 \cdot 10^{-8}$	5,143253
Внутри групп	0,193333	6	0,032222	-	-	-
Итого	42,62	8	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения для данных по выходу L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние значения температуры экстракции на выход можно считать доказанным. Наибольший выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана наблюдается при температуре экстракции 50<sup>0</sup>С.

Данные по динамической вязкости также характеризуются значением р значительно меньшим чем 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние температурного режима экстракции на качество конечного продукта является достоверным.

По-видимому, снижение выхода L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана при использовании высоких температур экстракции связано с частичной деградацией макромолекул полисахарида, что приводит к снижению молекулярной массы полимера и, как следствие, снижению динамической вязкости его растворов, что и подтверждается данными проведенного эксперимента.

Экстракция при комнатной температуре также приводит к меньшему выходу L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана с низким показателем динамической вязкости. По-видимому, это обусловлено снижением интенсивности экстракции макромолекул из

растительного сырья, за счет замедления процессов смачивания и растворения, тогда как для низкомолекулярных веществ эти процессы проходят наиболее легко.

Таким образом, оптимальным значением температуры экстрагента, используемым для получения субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана является 50 °С.

#### 3.3.1.4 Изучение влияния кратности экстракции на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Количество ступеней экстракции сырья может оказать существенное влияние на выход полупродукта. Увеличение выхода полупродукта объясняется изменением градиента его концентрации при смене растворителя, в результате экстрагирования остаточного количества целевого продукта из растительного сырья происходит с наибольшей эффективностью.

Для исследования влияния данного фактора сравнивали выходы L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана при использовании 1, 2 и 3 ступеней экстракции. В эксперименте листья березы экстрагировали водой очищенной (рН=7), соотношении сырье:экстрагент 1:20, при температуре 50°С однократно, без повторного экстрагирования шрота. Другой образец получали аналогично, и полученный шрот подвергали повторной экстракции при тех же условиях, полученные извлечения объединяли. В третьем образце сырье последовательно экстрагировали трижды при одинаковых условиях экстракции, полученные извлечения объединяли. Далее из полученного полупродукта был выделен L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронан, с использованием предварительно установленных технологических параметров, приведенных в разделе 3.2. В качестве критерия использовали выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана. Эксперимент повторяли 3 раза. Результаты эксперимента приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты эксперимента по изучению влияния кратности экстракции на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Количество ступеней экстракции	Выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана , %		
	1	2	3
1	3,22	3,23	3,21
2	3,23	3,24	3,22
3	3,25	3,24	3,24

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 9.

Таблица 9 – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния кратности экстракции на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Кратность экстракции, раз	Число степеней свободы	Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия		
1	2	9,63	3,21	0,0001		
2	2	9,71	3,236667	3,33*10 <sup>-5</sup>		
3	2	9,67	3,223333	0,000233		
Дисперсионный анализ						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	0,001067	2	0,000533	4,363636	0,067622	5,143253
Внутри групп	0,000733	6	0,000122			
Итого	0,0018	8	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения больше 0,05, соответственно критерий Фишера не значим, и влияние кратности экстракции на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана не является значимым фактором. Из результатов эксперимента видно, что проведение 2-х и 3-х ступенчатой экстракции нецелесообразно т.к. не приводит к значимому увеличению выхода конечного продукта.

Таким образом, использование одноступенчатой экстракции является оптимальной при получении субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

### 3.3.2 Определение оптимальных параметров упаривания экстракта

#### 3.3.2.1 Изучение влияния температуры упаривания на выход и качество L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Упаривание экстракта (рисунок 10) является одной из критических стадий процесса получения L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, так как полупродукт на данном этапе подвергается длительному воздействию повышенной температуры. С одной стороны, это может повлечь за собой снижение выхода конечного продукта, а также, частичную дегградацию макромолекул полисахарида и снижение качества конечного продукта, с другой стороны, сгущение экстракта при низкой температуре сопровождается большими

временными затратами, что нерационально с экономической точки зрения. В связи с этим был проведен экспериментальный подбор оптимального значения данного параметра.



Рисунок 10 – Процесс упаривания экстракта

В данном эксперименте была проведена экстракция 3-х серий листьев березы. После стадии экстракции, полученные извлечения упаривали на ротаторном испарителе при 30 °С (Р = 25 мбар), 50 °С (Р = 25 мбар), и 90 °С (Р = 75 мбар). Далее из полученного пролупродукта был выделен L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, с использованием предварительно установленных технологических параметров, приведенных в разделе 3.2. В качестве критериев использовали выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана и динамическую вязкость его 1,5% раствора. Результаты эксперимента приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты эксперимента по изучению влияния температуры упаривания экстракта на выход и динамическую вязкость раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Температура упаривания экстракта, °С	Время упаривания, мин.	Выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, %			Динамическая вязкость 1,5% раствора, мПа*с		
		1	2	3	1	2	3
30	105 мин	3,35	3,32	3,36	30,3	30,0	30,4
50	58 мин	3,33	3,35	3,37	30,1	30,3	30,3
90	42 мин	3,32	3,32	3,35	27,2	27,0	27,1

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 11.

Таблица 11 – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния температуры упаривания экстракта на выход и динамическую вязкость раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Выход						
Температура упаривания экстракта, °С	Число степеней свободы		Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия	
30	2		10,03	3,343333	0,000433	
50	2		10,05	3,35	0,0004	
90	2		9,99	3,33	0,0003	
Динамическая вязкость						
30	2		90,7	30,23333	0,043333	
50	2		90,7	30,23333	0,013333	
90	2		81,3	27,1	0,01	
Дисперсионный анализ (по выходу)						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	0,000622	2	0,000311	0,823 529	0,483026	5,143253
Внутри групп	0,002267	6	0,000378	-	-	-
Итого	0,002889	8	-	-	-	-
Дисперсионный анализ (по динамической вязкости)						
Между группами	19,63556	2	9,817778	441,8	3,07*10 <sup>-7</sup>	5,143253
Внутри групп	0,133333	6	0,022222	-	-	-
Итого	19,76889	8	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения для данных по выходу L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана больше 0,05, следовательно, критерий Фишера не значим, и соответственно, можно сделать вывод, что величина температуры упаривания экстракта не влияет на выход конечного продукта.

Для данных по динамической вязкости величина значения р значительно меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние значения температуры упаривания экстракта на вязкость конечного продукта доказано.

Значения динамической вязкости для образцов, упаренных при температурах 30<sup>0</sup>С и 50<sup>0</sup>С составляют 30 мПа\*с и более и имеют минимальное различие, следовательно, при данных условиях не происходит изменения качества готового продукта. Для образцов, упаренных при 90<sup>0</sup>С, значения динамической вязкости составили менее 30 мПа\*с, что свидетельствует об снижении качества готового продукта.

Из данных эксперимента видно, что упаривание экстракта при температуре 30<sup>0</sup>С не приводит к снижению выхода и качества готового продукта, но значительно увеличивает время проведения процесса. При 50<sup>0</sup>С так же не происходит достоверного уменьшения выхода и снижения качества субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, однако значительно сокращается время процесса. Использование температуры упаривания 90<sup>0</sup>С приводит к снижению выхода и показателей качества продукта.

Таким образом, оптимальная температура упаривания экстракта при получении субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана – 50<sup>0</sup>С.

### 3.3.2.2 Изучение влияния степени упаривания экстракта на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

От степени упаривания экстракта напрямую зависит эффективность последующей стадии спиртового осаждения. Недостаточное сгущение экстракта может привести к увеличению потерь конечного продукта и необоснованно высокому расходу осаждающего агента (этанола). Оптимальное значение данного параметра было установлено экспериментально. Для этого были получены 4 серии экстракта листьев березы, которые были упарены на роторном испарителе при температуре 50<sup>0</sup>С в 5, 4, 3 и в 2 раза, и далее из полученных полупродуктов был выделен L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, с использованием предварительно установленных технологических параметров, приведенных в разделе 3.2. В качестве критерия использовали выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

При 5-кратном упаривании экстракта, в испарительной колбе наблюдалось пленкообразование и залипание экстракта, что не позволило провести следующие технологические стадии и получить стандартизованный конечный продукт. Поэтому данная серия была исключена из статистической обработки, и был сделан вывод о нецелесообразности 5 кратного упаривания экстракта. Результаты эксперимента приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты эксперимента по изучению влияния степени упаривания экстракта на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Степень упаривания экстракта, раз	Выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, %		
	1	2	3
5	-	-	-
4	3,35	3,34	3,32
3	3,27	3,29	3,28
2	3,17	3,13	3,13

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 13. Графическое отражение полученных результатов представлено на рисунке 11.

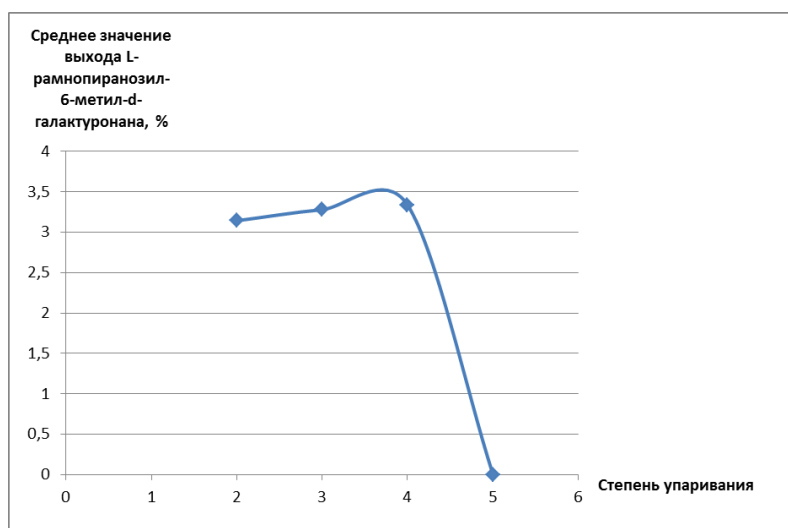


Рисунок 11 – График зависимости выхода L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана от степени упаривания экстракта

Таблица 13 – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния степени упаривания экстракта на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Степень упаривания экстракта, раз	Число степеней свободы	Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия		
4	2	10,01	3,336667	0,000233		
3	2	9,84	3,28	0,0001		
2	2	9,43	3,143333	0,000533		
Дисперсионный анализ						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F-критическое
Между группами	0,059267	2	0,029633	102,5769	2,29*10 <sup>-5</sup>	5,143253

Внутри групп	0,001733	6	0,000289			
Итого	0,061	8	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние степени упаривания на выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана можно считать доказанным. Наибольший выход продукта наблюдается при степени упаривания в 4 раза. Увеличение степени упаривания приводит к пленкообразованию и не позволяет реализовать дальнейшие стадии технологического процесса.

Таким образом, оптимальным при получении субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана является упаривание экстракта в 4 раза.

### **3.3.3 Определение оптимальных параметров спиртового осаждения**

3.3.3.1 Изучение влияния соотношения концентрат:этанол на выход и качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Выделение полисахарида из сгущенного водного извлечения (концентрата) проводят методом осаждения (Рисунок 12), в качестве осаждающего агента используется этанол. Соотношение количеств концентрата и осаждающего агента оказывает влияние на эффективность технологии – так, недостаточное количество этанола может привести к неполному осаждению L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана из водного раствора, а использование избытков этанола ведет к необоснованному удорожанию конечного продукта. Кроме того, избыточная концентрация осаждающего агента может привести к соосаждению балластных низкомолекулярных веществ, которые потребуют введения дополнительных стадий очистки на дальнейших этапах технологического процесса, что также усложняет технологию и делает ее менее рациональной.



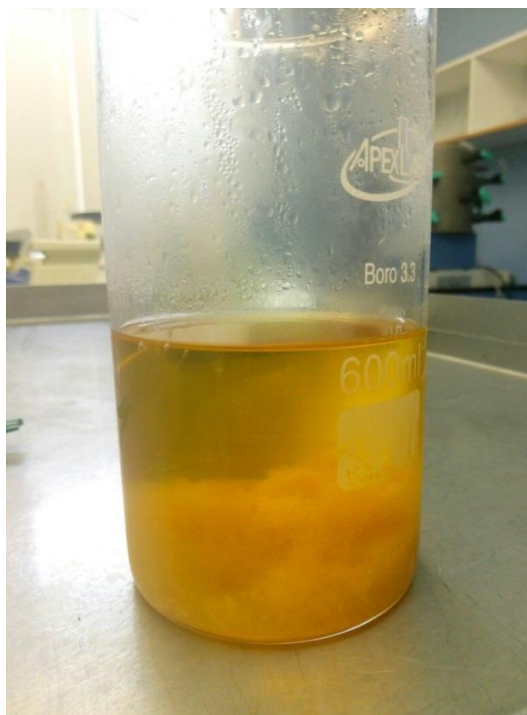


Рисунок 12 – Процесс осаждения L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

В эксперименте изучалось влияние следующих соотношений концентрат:этанол: 1:2, 1:3 и 1:4. Приемлемость исследуемого параметра оценивали по влиянию выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана и на динамическую вязкость его 1,5% раствора. Результаты эксперимента приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты эксперимента по изучению влияния соотношения концентрат:этанол на выход и динамическую вязкость раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Соотношение концентрат:этанол	Выход L- рамнопиранозил-6- метил-d- галактуронана , %			Вязкость 1,5% раствора, мПа*с		
	1	2	3	1	2	3
1:2	3,31	3,34	3,33	24,8	24,5	24,6
1:3	3,39	3,40	3,38	30,5	30,3	30,5
1:4	3,41	3,43	3,41	30,5	30,4	30,6

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 15.

Таблица 15 – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния соотношения концентрат:этанол на выход и динамическую вязкость раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Выход						
Соотношение концентрат:этанол	Число степеней свободы		Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия	
1:2	2		9,98	3,326667	0,000233	
1:3	2		10,17	3,39	0,0001	
1:4	2		10,25	3,416667	0,000133	
Динамическая вязкость						
1:2	2		73,9	24,63333	0,023333	
1:3	2		91,3	30,43333	0,013333	
1:4	2		91,5	30,5	0,01	
Дисперсионный анализ (по выходу)						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F-критическое
Между группами	0,012822	2	0,006411	41,21429	0,000312	5,143253
Внутри групп	0,000933	6	0,000156	-	-	-
Итого	0,013756	8	-	-	-	-
Дисперсионный анализ (по динамической вязкости)						
Между группами	68,06222	2	34,03111	2187,714	2,57*10 <sup>-9</sup>	5,143253
Внутри групп	0,093333	6	0,015556	-	-	-
Итого	68,15556	8	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения для данных по выходу L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние соотношения концентрат:этанол на выход конечного продукта можно считать доказанным.

Для данных по динамической вязкости 1,5% раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана величина значения р значительно меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние значения соотношения концентрат:этанол на качество продукта доказано.

Из данных эксперимента видно, что для образцов, полученных осаждением в соотношении концентрат:этанол 1:2, показатели динамической вязкости не укладываются в допустимый интервал, что свидетельствует о неприемлемом качестве конечного продукта, получаемого при использовании данного параметра. Более того, использование соотношения концентрат:этанол 1:2, приводит к значительно меньшему выходу L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана. Значения динамической вязкости образцов, полученных осаждением в соотношении концентрат:этанол – 1:3 и 1:4, укладываются в допустимый интервал. Однако, различия в выходе и качестве конечного продукта серий,

полученных осаждением в соотношении концентрат:этанол – 1:3 и 1:4, несущественны, соотношение 1:3 является более рациональным по затратам осаждающего агента (этанола).

Таким образом, оптимальным, при получении субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, является использование соотношения концентрат:этанол – 1:3.

### 3.3.3.2 Изучение влияния концентрации этанола (осаждающего агента) на выход и качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Возможность использования регенерированного осаждающего агента (этанола) может существенно улучшить рациональность технологии. Кроме того, исходная концентрация осаждающего агента может оказывать влияние на качество полупродукта – так, высокая концентрация этанола может приводить к необратимому осаждению части полисахарида и отрицательно влиять на выход готового продукта.

В эксперименте проводилось исследование влияния концентрации осаждающего агента (этанола) в концентрациях 70, 80 и 96% на выход и качество готового продукта. Эксперимент проводился в трех повторностях. Приемлемость исследуемого параметра оценивали по влиянию выхода L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана и на динамическую вязкость его 1,5% раствора. Результаты эксперимента приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты эксперимента по изучению влияния концентрации этанола (осаждающего агента) на выход и динамическую вязкость раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Концентрация этанола, %	Выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, %			Вязкость 1,5% раствора, мПа*с		
	1	2	3	1	2	3
70	2,10	2,13	2,07	24,2	24,5	24,4
80	3,40	3,41	3,43	30,5	30,5	30,6
96	3,38	3,38	3,40	30,5	30,4	30,5

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 17.

Таблица 17 – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния концентрации этанола (осаждающего агента) на выход и динамическую вязкость раствора L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Выход						
Концентрация этанола, %	Число степеней свободы		Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия	
70	2		6,3	2,1	0,0009	
80	2		10,24	3,413333	0,000233	
96	2		10,16	3,386667	0,000133	
Динамическая вязкость						
70	2		73,1	24,36667	0,023333	
80	2		91,6	30,53333	0,003333	
96	2		91,4	30,46667	0,003333	
Дисперсионный анализ (по выходу)						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F-критическое
Между группами	3,381067	2	1,690533	4003,895	4,2*10 <sup>-10</sup>	5,143253
Внутри групп	0,002533	6	0,000422	-	-	-
Итого	3,3836	8	-	-	-	-
Дисперсионный анализ (по динамической вязкости)						
Между группами	75,24222	2	37,62111	3762,111	5,06*10 <sup>-10</sup>	5,143253
Внутри групп	0,06	6	0,01	-	-	-
Итого	75,30222	8	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения для данных по выходу L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние концентрации этанола на выход готового продукта можно считать доказанным.

Для данных по динамической вязкости величина значения р значительно меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние концентрации этанола на вязкость конечного продукта доказано.

Из данных эксперимента видно, что для образцов, со значением концентрации этанола 70% показатели динамической вязкости не укладываются в допустимый интервал, что свидетельствует о неприемлемом качестве конечного продукта. Значения динамической вязкости для образцов серий со значениями концентраций 80 и 96% укладываются в допустимый интервал и не имеют значительного различия (Рисунок 13). Наибольший выход L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана наблюдался при концентрации этанола 80%.

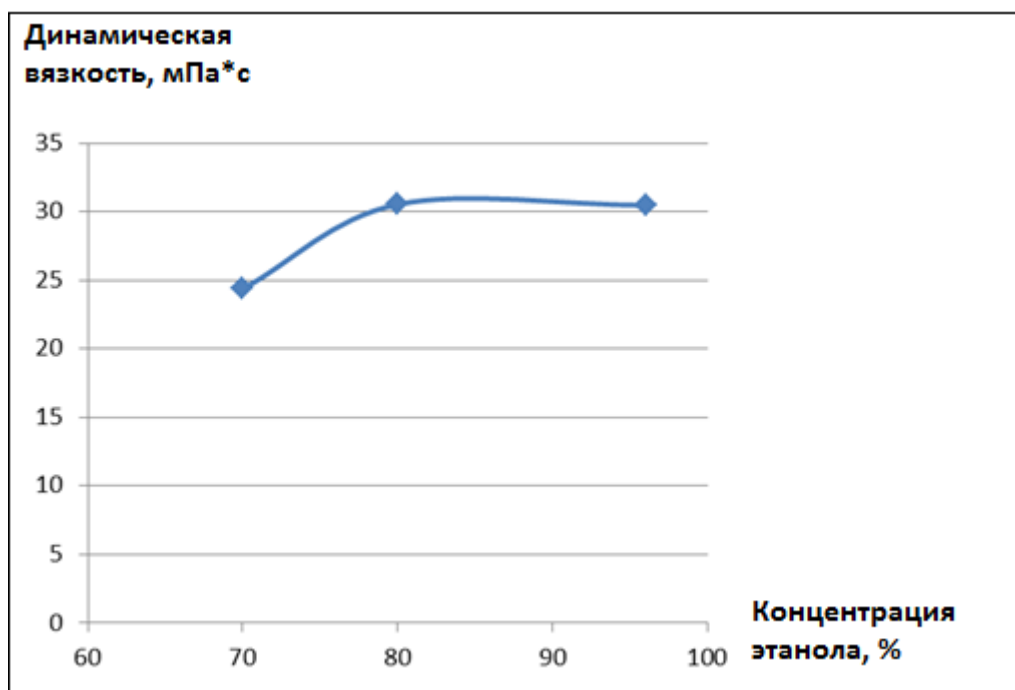


Рисунок 13 - График зависимости средних значений динамической вязкости от концентрации этанола (осаждающего агента)

Таким образом, оптимальным для осаждения концентрата, при получении субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, является использование этанола в концентрации 80%, который обеспечивает получение более высокого выхода готового продукта приемлемого качества, а также позволяет использовать для осаждения регенерированный этанол.

### 3.3.4 *Определение оптимальных параметров очистки от низкомолекулярных примесей*

#### 3.3.4.1 Изучение влияния количества ступеней очистки на качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Для получения конечного продукта, соответствующего установленным параметрам качества, необходимо проведение его достаточной очистки от низкомолекулярных примесей, которая достигается посредством многоступенчатой отмывки полупродукта осаждающим агентом (этанолом). Для установления оптимального количества стадий отмывки, был проведен эксперимент по оценке влияния количества стадий на качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана. Показателем качества субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, характеризующим содержание низкомолекулярных примесей, является динамическая вязкость его 1,5% раствора.

В ходе эксперимента, 20 мл осадка, полученного после стадии осаждения L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана (Рисунок 14) помещали в круглодонную колбу и добавляли в нее 50 мл 96% этанола (соотношение 1:2,5 по объему). Смесь перемешивали

в течение 1 часа, при температуре водяной бани 85 °С. Далее осадок отфильтровывали, забирали пробу (1,0 г) осадка на сушку и анализ динамической вязкости (Образец 1-ой ступени очистки), а оставшееся количество осадка повторно переносили в колбу и начинали второй этап экстракции. Последующие этапы проводили при аналогичных условиях, отбирая пробы (по 1,0 г) осадка на сушку и анализ динамической вязкости – образцы 2-ой и 3-ей, 4-ой и 5-ой ступеней очистки). Эксперимент повторяли 3 раза. Результаты эксперимента приведены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты эксперимента по оценке влияния количества ступеней очистки на качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

Количество ступеней очистки	Динамическая вязкость 1,5 раствора L-рамнопиранозил-6-метил-d-галактуронана, мПа*с		
	1	2	3
1	25,7	25,8	25,8
2	27,2	27,2	27,4
3	29,5	29,4	29,4
4	30,2	30,3	30,0
5	30,3	30,5	30,2



Рисунок 14 – Стадия очистки L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 19.

Таблица 19 – Статистическая обработка результатов эксперимента по оценке влияния количества ступеней очистки на качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Этап очистки	Число степеней свободы	Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия		
1	2	77,3	25,76667	0,003333		
2	2	81,8	27,26667	0,013333		
3	2	88,3	29,43333	0,003333		
4	2	90,5	30,16667	0,023333		
5	2	91,0	30,34	0,0268		
Дисперсионный анализ						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	47,94571	4	11,98643	854,5456	1,26*10 <sup>-12</sup>	3,47805
Внутри групп	0,140267	10	0,014027	-	-	-
Итого	48,08597	14	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения для данных по очистке полупродукта с использованием разного количества стадий меньше 0,05, следовательно, критерий Фишера значим, и влияние количества ступеней очистки на значения динамической вязкости можно считать доказанным. Приемлемое значение динамической вязкости наблюдается у образцов после 4 этапа очистки. Для сравнения степени очистки образцов на последнем этапе была отдельно проведена статистическая обработка данных, полученных на 4 и 5 этапах. Результаты представлены в таблице 20. Графическое отражение полученных результатов представлено на рисунке 15.

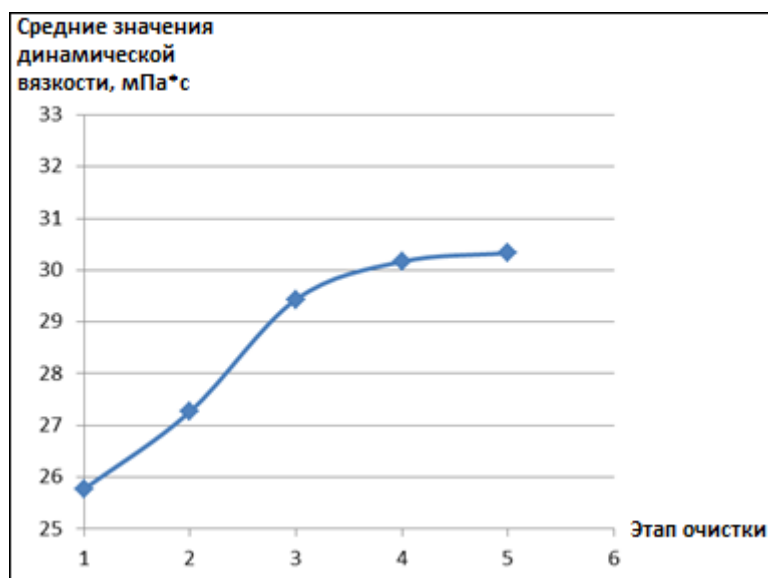


Рисунок 15 – График зависимости средних значений динамической вязкости от этапа очистки

Таблица 20 – Статистическая обработка результатов эксперимента по оценке степени влияния 5 этапа очистки на качество субстанции L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронана

Этап очистки	Число степеней свободы	Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия		
4	2	90,5	30,16667	0,023333		
5	2	91	30,33333	0,023333		
Дисперсионный анализ						
Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P- Значение	F критическое
Между группами	0,041667	1	0,041667	1,786	0,252401	7,708647
Внутри групп	0,093333	4	0,023333	-	-	-
Итого	0,135	5	-	-	-	-

Поскольку величина р-значения больше 0,05, следовательно, критерий Фишера не значим, и влияние 5 этапа очистки на качество конечного продукта является не значительным.

Таким образом, для получения субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана приемлемого качества необходимо проведение не менее 4 ступеней очистки от низкомолекулярных примесей.

### 3.3.5 Определение оптимальных параметров сушки конечного продукта

#### 3.3.5.1 Изучение влияния различных методов сушки на качество конечного продукта.

Способ сушки напрямую влияет на качество конечного продукта. Полисахариды являются термолабильными веществами и, кроме того, питательным субстратом для различных микроорганизмов, в результате чего наличие избыточной влажности может привести к снижению микробиологических показателей конечного продукта и его порче. Вследствие этого, к методу и режиму сушки предъявляются особые требования. Метод должен обеспечивать наиболее быструю и глубокую сушку до требуемых показателей влажности, при этом, не оказывая влияния на качество конечного продукта.

В эксперименте было исследовано 2 метода сушки, конвективный, при повышенной температуре и лиофильный:

По первому методу, образец полупродукта L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, полученный после стадии очистки от НМП, распределяли ровным слоем толщиной не более 5 мм на лотке из нержавеющей стали с пергаментной подложкой и помещали сушиться в термостат при температуре 40 °С на 48 часов (Рисунок 16).

По второму методу, образец полупродукта L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана, полученный после стадии очистки от НМП, вносили в колбу для лиофильной сушки, которую помещали морозилку и оставляли до полного замораживания при -40 °С. Подготовленный образец лиофилизировали в течение 48 часов (Рисунок 17).



По окончании сушки определяли влажность и динамическую вязкость 1,5% раствора полученных образцов. Эксперимент повторяли 3 раза. Результаты эксперимента приведены в таблице 21.



Рисунок 16 – Процесс конвективной сушки субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

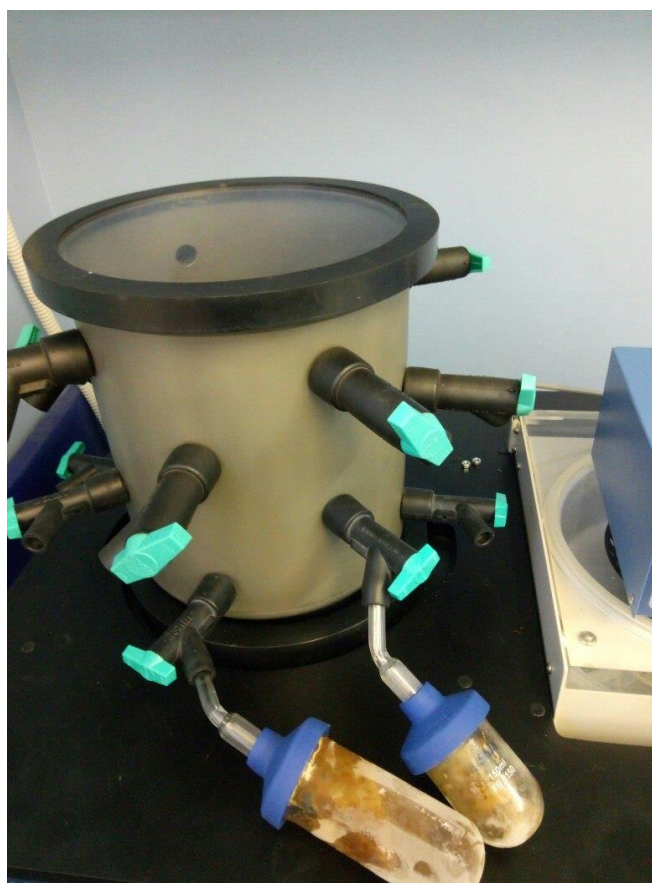


Рисунок 17 – Процесс лиофильной сушки субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Таблица 21 – Результаты эксперимента по изучению влияния различных методов сушки на качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

Способ сушки	Время сушки, дни	Влажность, %			Динамическая вязкость 1,5 раствора L-рамнопиранозил-6-метил-d-галактуронана, мПа*с		
		1	2	3	1	2	3
Конвективный	2	7,82	7,99	7,78	30,1	30,3	30,1
Лиофильный	2	3,00	3,27	3,14	30,0	30,2	30,1

Полученные данные позволили рассчитать критерий Фишера, который использовался для оценки степени влияния фактора. Статистическая обработка результатов отражена в таблице 22.

Таблица 22 – Статистическая обработка результатов эксперимента по изучению влияния различных методов сушки на качество субстанции L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

группы

Способ сушки	Число степеней свободы	Сумма значений	Среднее значение	Дисперсия
Конвективный	2	90,5	30,16667	0,013333
Лиофильный	2	90,3	30,1	0,01

Дисперсионный анализ

Источник дисперсии	SS	df	MS	F	P-Значение	F критическое
Между группами	0,006667	1	0,006667	0,571	0,491767	7,708647
Внутри групп	0,046667	4	0,011667	-	-	-
Итого	0,053333	5	-	-	-	-

Поскольку для показателя динамической вязкости величина р-значения больше 0,05, следовательно, критерий Фишера не значим, из чего следует, что метод сушки не влияет на качество конечного продукта.

Из результатов эксперимента видно, что оба использованных метода сушки не снижают качество готового продукта. Однако, использование метода лиофилизации обеспечивает более глубокую степень высушивания.

Таким образом, оптимальным для получения субстанции L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронана является использование лиофильной сушки.

### **3.4. Оптимизированная технология получения субстанции L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронана**

В результате проведенных экспериментов были определены оптимальные параметры лабораторной технологии получения фармацевтической субстанции L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронана. После внесенных корректировок, данная технология выглядит следующим образом:

#### **1. Подготовка сырья и экстрагента**

##### **1.1. Просеивание сырья**

Взвешивают на электронных весах 300 г измельченных листьев березы повислой. Сырьё просеивают через набор сит. Фракции 2-5 мм собирают, взвешивают 250 г.

##### **1.2. Приготовление экстрагента**

В качестве экстрагента используют воду очищенную со значением pH равным 7. Вода очищенная изначально имеет значение pH равное 7, вследствие этого, добавление кислот или щелочей, для достижения определенного значения pH не требуется. Мерным цилиндром отбирают 5000 мл воды очищенной.

#### **2. Получение экстракта**

##### **2.1. Экстрагирование сырья**

Навеску измельченных листьев березы массой 250 г смешивают с 5000 мл воды очищенной (pH=7) и нагревают на водяной бане при температуре 50<sup>0</sup>С в течение 2 часов.

##### **2.2. Фильтрация**

Полученную смесь фильтруют через тканевый фильтр и передают на стадию упаривания.

##### **2.3. Упаривание экстракта**

Полученное извлечение (Около 4450 мл) упаривают на роторном испарителе при температуре 50 °С и давлении 25 мбар до 1113 мл.

#### **3. Получение L-рамнопиранозил-6-O-метил-d-галактуронана**

##### **3.1. Центрифугирование**

Упаренный экстракт центрифугируют в течение 10 минут, при 4400 об/мин., для удаления оставшихся частиц сырья. Супернатант отделяют от осадка методом декантирования.

##### **3.2. Подготовка 80% этанола для осаждения**

Мерным цилиндром отмеряют 2781,67 мл 96% этанола. К нему добавляют 556,34 мл воды очищенной. Полученный раствор перемешивают.

### 3.3.Осаждение полисахаридов

К полученному густому экстракту медленно при перемешивании прибавляют 3338 мл 80% раствор этилового спирта в воде (соотношение экстракт:этанол - 1:3).

### 3.4.Отстаивание, фильтрование

Осажденные полисахариды оставляют в холодильнике (+4 °С) в течение 1 часа для отстаивания осадка. Выпавший осадок отфильтровывают под вакуумом через бумажный фильтр с помощью системы Бунзена-Бюхнера.

## 4. Очистка L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана

### 4.1.Приготовление спиртовой смеси ФС

*1 ступень очистки:* Полученный влажный осадок ФС вносят в колбу роторного испарителя предварительно определив его объем (155 мл). Затем осадок смешивали с 96% этанолом в объемном соотношении 1:2,5. Смесь перемешивают в течение 1 часа, при температуре водяной бани 85 °С. Фильтрацию осуществляют с помощью системы Бунзена-Бюхнера.

*2 ступень очистки:* Осадок на фильтре переносят в стеклянную колбу и повторяют процедуру очистки аналогично 1 ступени.

*3 и 4 ступени очистки:* проводятся аналогично 2 ступени.

### 4.2.Фильтрование

Смесь отфильтровывают через бумажный фильтр, используя систему Бунзена-Бюхнера.

## 5. Заморозка и сушка

### 5.1.Заморозка

Осадок L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана переносят с фильтра в емкость для лиофильной сушки, замораживают при -40 °С в течение 12 часов.

### 5.2.Сушка

Высушивают с помощью сублимационной сушки при давлении менее 0,001 Атм в течение 2 суток. Полученный готовый продукт подвергают стандартизации.

Хранение готового продукта осуществляют в холодильнике при +4 °С в герметично закрывающейся таре.

### Заключение по разделу

Таким образом, на данном этапе была оптимизирована лабораторная технология активной фармацевтической субстанции на основе полисахарида березы L-рамнопиранозил-6-О-метил-d-галактуронана.

## **4. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ**

Целью раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» является определение перспективности и успешности научно-исследовательского проекта по оптимизации технологии активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы, разработка механизма управления и сопровождения конкретных проектных решений на различных этапах реализации научной работы. Выделение полисахаридов из растительного сырья является сложным и трудоемким процессом, часто сопровождающимся большими материальными затратами. Выбор методов для изолирования веществ и установления их структуры существенно влияет на финансовые издержки проекта. Поэтому наши основные задачи по данному разделу сводились к выбору рациональных подходов к исследованию и получению полисахаридов из листьев березы, расчету финансовой эффективности и определению возможных рисков проекта. Для оценки коммерциализации и выявления основных потребителей проекта, нами проведено сегментирование рынка.

### **4.1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ**

#### **4.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования**

Для анализа потребителей результатов научного исследования необходимо подвергнуть рассмотрению целевой рынок и провести его сегментирование.

Целевой рынок – сегменты рынка, на котором в будущем будут продаваться разработки. В свою очередь, сегмент рынка – это особым образом выделенная часть рынка, группы потребителей, обладающих определенными общими признаками.

Основными целевым рынком для внедрения результатов проекта является фармацевтическая промышленность. Исходя из этого, можно выделить 2 основных группы потребителей данного продукта. Во-первых, это фармацевтические заводы, осуществляющие производство растительных лекарственных средств. Во-вторых, компании по производству биологически-активных добавок к пище (БАД).

Таким образом, проведено сегментирование потребителей разработки. Выделены следующие наиболее крупные сегменты рынка: фармацевтические заводы и компании по производству БАД.

#### **4.1.2. Оценка готовности проекта к коммерциализации**

Далее необходимо провести оценку проекта к коммерциализации с использованием таблицы, в которой содержатся показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенциям разработчика научного проекта. Коммерциализация –

процесс экономической (рыночной) реализации результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ. В данном процессе активно взаимодействуют разные стороны – разработчики, инвесторы, а также сопровождающие и обслуживающие непосредственно данный процесс участники. Перечень вопросов, касающихся готовности настоящего проекта к коммерциализации приведен в таблице 23.

Таблица 23 – Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

№ п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1.	Определен имеющийся научно-технический задел	5	5
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	4	4
3.	Определены отрасли и технологии (товары и услуги) для предложения на рынке	4	4
4.	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	3	4
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	5	5
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	4	4
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	2	2
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	3	3
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	2	2
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	2	2
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	2	2
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	4	4
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	4	4
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	4	5
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	4	5
	<b>ИТОГО БАЛЛОВ</b>	52	55

При проведении анализа по таблице, приведенной выше, по каждому показателю ставится оценка по пятибалльной шкале. При этом система измерения по каждому направлению (степень проработанности научного проекта, уровень имеющихся знаний у разработчика) отличается. Так, при оценке степени проработанности научного проекта 1 балл означает не проработанность проекта, 2 балла – слабую

проработанность, 3 балла – выполнено, но в качестве не уверен, 4 балла – выполнено качественно, 5 баллов – имеется положительное заключение независимого эксперта. Для оценки уровня имеющихся знаний у разработчика система баллов принимает следующий вид: 1 означает не знаком или мало знаю, 2 – в объеме теоретических знаний, 3 – знаю теорию и практические примеры применения, 4 – знаю теорию и самостоятельно выполняю, 5 – знаю теорию, выполняю и могу консультировать.

На основании проведенных расчетов, можно сделать заключение о перспективности проекта выше среднего (от 45 до 59). Проведение маркетинговых исследований рынков сбыта и разработка бизнес-плана позволит увеличить степень проработанности проекта.

## 4.2. Разработка устава научно-технического проекта

Устав проекта документирует бизнес-потребности, текущее понимание потребностей заказчика проекта, а также новый продукт, услугу или результат, который планируется создать.

### 4.2.1. Определение целей и результатов проекта

Информация по заинтересованным сторонам проекта представлена в табл. 24.

Таблица 24– Заинтересованные стороны проекта

<b>Заинтересованные стороны проекта</b>	<b>Ожидание заинтересованных сторон проекта</b>
Министерство науки и образования РФ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- оформление патентов;</li> <li>- разработка методик качественного и количественного определения;</li> <li>-доклады на конференциях разного уровня;</li> <li>-публикация статей в журналах с высоким импакт-фактором.</li> </ul>

В таблице 25 представлена информация об иерархии целей проекта и критериях достижения целей.

Таблица 25 – Цели и результат проекта

<b>Цели проекта</b>	Оптимизировать технологию получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы
<b>Ожидаемые результаты проекта</b>	Получить данные о химической структуре и гипополидеической активности субстанции на основе полисахаридов березы. Установить оптимальные технологические параметры.
<b>Критерии приемки результата проекта</b>	Результат должен технологически, экономически и экологически обоснован.
<b>Требования к результату проекта</b>	Проблема проекта должна иметь социально-экономическое значение. Результат должен быть промышленно применим.

#### 4.2.2. Организационная структура проекта

Необходимо определить участников рабочей группы, определить роль каждого участника в проекте, а также прописать функции каждого участника проекта и определить трудозатраты. Организационная структура проекта представлена в таблице 26.

Таблица 26 – Рабочая группа проекта.

№ п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, час.
1.	Белоусов М.В.	Руководитель проекта	Отвечает за реализацию проекта, координирует деятельность участников проекта	1506
2.	Ровкина К.И.	ассистент	Обеспечивает снабжение необходимыми материалами для работы, организует рабочее место	1506
3.	Якимова Т.Б.	эксперт	Консультирует по вопросам финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения	2
4.	Горбенко М.В.	эксперт	Консультирует по вопросам безопасности жизнедеятельности	2
5.	Степура С.Н.	эксперт	Консультирует по части английского языка	2
6.	Гурьев А.М.	исполнитель	Выполняет отдельные работы по проекту	2200

#### 4.2.3. Ограничения и допущения по проекту

Ограничения проекта – это все факторы, которые могут послужить ограничением степени свободы участников команды проекта, а так же «границы проекта» - параметры проекта или его продукта, которые не будут реализованных в рамках данного проекта. Данные представлены в таблице 27

Таблица 27 – Ограничения проекта

Фактор	Ограничения /допущения
3.1. Бюджет проекта, руб.	400 000
3.1.1. Источник финансирования	Министерство образования и науки РФ
3.2. Сроки проекта	01.09.2018 г. – 31.08.2020 г.
3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом	01.01.2018 г.



### 4.3. Планирование процесса управления научно-техническим проектом

Группа процессов планирования состоит из процессов, осуществляемых для определения общего содержания работ, уточнения целей и разработки последовательности действий, требуемых для достижения данных целей. План управления включает в себя следующие элементы:

#### 4.3.1. Иерархическая структура работ проекта

*Иерархическая структура работ* (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. На рисунке 18 представлен шаблон иерархической структуры работ по проекту.



Рисунок 18 – Иерархическая структура работ проекта

#### 4.3.2. Контрольные события проекта

В рамках данного раздела необходимо определить ключевые события проекта, определить их даты и результаты, которые должны быть получены по состоянию на эти даты. Эта информация представлена в таблице 28.

Таблица 28 – Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	Анализ литературных данных	Сентябрь-октябрь, 2018 г.	Литературный обзор в ВКР
2	Постановка цели и задач	Ноябрь 2018	Раздел цели и задачи в ВКР
3	Разработка плана экспериментальных работ	Ноябрь 2018	План работ
4.	Выделение полисахаридов из растительного сырья	Декабрь 2018 – Апрель 2019 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
5.	Установление структуры выделенных полисахаридов	Май – Октябрь, 2019 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
6.	Исследование гипополидеммической активности субстанции на основе полисахаридов березы	Ноябрь 2019 – Январь 2020 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
7.	Отработка оптимальных технологических параметров получения активной фармацевтической субстанции	Январь – Февраль, 2020 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
8.	Обсуждение результатов, доработка экспериментальной части ВКР	Март – Апрель, 2020 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
9.	Оформление ВКР	Апрель – Июнь, 2020 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР

#### 4.3.3. План проекта

В рамках планирования научного проекта построен календарный и линейный графики проекта. Линейный график представлен в виде таблицы 29.

Таблица 29 – Календарный план проекта

<b>Код работы (из ИСР)</b>	<b>Название</b>	<b>Длительность, дни</b>	<b>Дата начала работ</b>	<b>Дата окончания работ</b>	<b>Состав участников (ФИО ответственных исполнителей)</b>
1.	Анализ литературных данных	53	01.09.18	04.11.18	Гурьев А.М.
2.	Постановка цели и задач	2	6.11.18	8.11.18	Гурьев А.М., Белоусов М.В
3.	Разработка плана экспериментальных работ	5	08.11.18	13.11.18	Гурьев А.М., Белоусов М.В
4.	Выделение полисахаридов из растительного сырья	109	14.11.18	2.04.19	Гурьев А.М. Ровкина К.И.
5.	Установление структуры выделенных полисахаридов	74	3.04.19	29.09.19	Гурьев А.М. Ровкина К.И.
6.	Исследование гипополидеммической активности субстанции на основе полисахаридов березы	78	1.10.19	10.01.20	Гурьев А.М. Ровкина К.И.
7.	Отработка оптимальных технологических параметров получения активной фармацевтической субстанции	42	11.01.20	28.02.20	Гурьев А.М.
8.	Обсуждение результатов, доработка экспериментальной части ВКР	25	1.03.20	30.03.20	Гурьев А.М. Белоусов М.В
9.	Оформление ВКР	54	1.04.20	05.06.20	Гурьев А.М.
ИТОГО, дней		442			

### *Разработка графика Ганта*

Диаграмма Ганта – это тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. График приведен в таблице 30.

Таблица 30 – Календарный план-график выполнения проекта

Код работ	Вид работ	Исполнители	Т, кал.	Продолжительность выполнения работ																			
				Сент.		Октяб.		Нояб.		Дек.		Янв.		Фев.		Март		Апр.		Май		Июнь	
			дней	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	Анализ литературных данных	Гурьев А.М.	53																				
2	Постановка цели и задач	Гурьев А.М., Белоусов М. В	2																				
3	Разработка плана экспериментальных работ	Гурьев А.М., Белоусов М. В	5																				
4	Выделение полисахаридов из растительного сырья	Гурьев А.М. Ровкина К.И.	109																				
5	Установление структуры выделенных полисахаридов	Гурьев А.М.	74																				
6	Исследование гипополипидемической активности субстанции на основе полисахаридов березы	Гурьев А.М. Ровкина К.И.	78																				

7	Отработка оптимальных технологических параметров получения активной фармацевтической субстанции	Гурьев А.М.	42																				
8	Обсуждение результатов, доработка экспериментальной части ВКР	Гурьев А.М., Белоусов М. В	25																				
9	Оформление ВКР	Гурьев А.М.	54																				



- первый год



- второй год

#### 4.3.4. Организационная структура проекта

Проектная организационная структура научного проекта и представлена на рисунке 19.



Рисунок 19 – Проектная организационная структура проекта

#### 1. Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности (табл. 31).

Таблица 30а – Матрица ответственности

Этапы проекта	Белоусов М.В., консультант	Ровкина К.И. ассистент	Якимова Т.Б., Эксперт	Горбенко М.В., Эксперт	Степура С.Н. Эксперт	Гурьев А.М. Исполните ль
Составление технического задания	О					
Изучение литературы		О, И				И, О
Выбор направления исследования	О					И, О
Теоретические и экспериментальн ые исследования		И				И, О
Обобщение и оценка результатов	О	И				И, О
Разработка технической документации и проекти-рование	О					И, О
Оформление комплекта документации	О, С		О, С	О, С	О, С	И, О

Степень участия в проекте может характеризоваться следующим образом:

*Ответственный (О)* –лицо, отвечающее за реализацию этапа проекта и контролирующее его ход.

*Исполнитель (И)* – лицо (лица), выполняющие работы в рамках этапа проекта.

*Утверждающее лицо (У)* – лицо, осуществляющее утверждение результатов этапа проекта (если этап предусматривает утверждение).

*Согласующее лицо (С)* – лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов этапа требованиям.

## 2. План управления коммуникациями проекта

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. План управления коммуникациями приведен в таблице 32.

Таблица 30б – План управления коммуникациями

№ п/п	Какая информация передается	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
1.	Статус проекта	Исполнитель проекта	Консультанту	Еженедельно (среда)
2.	Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель проекта	Консультанту	Еженедельно (понедельник)
3.	Документы и информация по проекту	Исполнитель проекта	Консультанту, участникам проекта	Не позже сроков графиков и контрольных точек
4.	О выполнении контрольной точки	Исполнитель проекта	Консультанту	Не позже дня контрольного события по плану управления

## 3. Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя неопределенные события, которые могут возникнуть в проекте и вызвать последствия, которые повлекут за собой нежелательные эффекты. Возможные риски проекта приведены в таблице 33.

Таблица 30в – Реестр рисков проекта.

№ п/п	Риск	Вероятность	Влияние риска	Уровень риска	Способы смягчения	Условия наступления
1.	Технический	3	5	высокий	Повышение требований, проработка технологии	Неисправность оборудования
2.	Организационный	5	5	высокий	Финансирование проекта, расстановка приоритетов	Нехватка ресурсов
3.	Управление проектом	1	4	низкий	Долгосрочное планирование	Некомпетентное управление

### 4.3.5. Определение затрат на проектирование (смета затрат)

#### 4.3.5.1. Расчет материальных затрат

Данная статья включает стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта: приобретаемые со стороны сырье и материалы, необходимые для создания научно-технической продукции; покупные материалы, используемые в процессе создания научно-технической продукции для обеспечения нормального технологического процесса.

Все затраты на оборудование, реактивы, лабораторную посуду и средства защиты приведены в таблицах 31 -35.

Стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного научного проекта и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в виде амортизационных отчислений (табл.31).

Таблица 31 – Материальные затраты на оборудование

Наименование	Количество, шт	Стоимость с НДС, руб/шт	Сумма, руб	Срок эксплуатации, лет	Амортизация, руб
Мельница лабораторная	1	78740	78740	5	15748
Система фильтрации	1	148000	148000	5	29600
Итого: <b>226740</b>			Амортизация: <b>45348,00</b>		

Таблица 32 – Материальные затраты на реактивы

Наименование	Кол-во	Стоимость с НДС	Сумма, руб
Стандарты полисахаридов ММР	1 уп.	630,00 (за 20 уп.)	31,50
Этиловый спирт	1л	115,00 (1л)	115,00
Вода очищенная	1 л	65,0 (5л)	13,00
Ацетонитрилл	1 л	870,00 (1л)	870,00
DEAE-целлюлоза	0,01 кг	500,00 (кг)	5,00
Соляная кислота	0,01 л	120,00 (л)	1,20
Кальция хлорид	0,500 кг	100,00 (кг)	50,00
Итого:			<b>1085,7</b>



Таблица 33 – Материальные затраты на лабораторную посуду

Наименование	Кол-во, шт	Стоимость с НДС	Сумма, руб
Колбы, стеклянные 1 литр	4	1 л – 210,00 – 1 шт 50 мл – 100,0 – 2 шт 100 мл – 120,0 – 2 шт	430,00
Пробирки центрифужные 15 мл	20	519,00 (500 шт)	20,76
Дозатор одноканальный 100 мкл	1	4000,00	4000,00
Стрейтч-пленка	1 уп	150,00	150,00
Кювета проточная	3 шт	490,00	1470,00
Мерные колбы на 500 мл	3 шт	780,00	2340,00
Мерные колбы на 1000 мл	6 шт	750,00	4500,00
Дозатор многоканальный 200 мкл	1 шт	4500,00	4500,00
Итого:			17410,76

Таблица 34 – Материальные затраты на средства защиты

Наименование	Кол-во, шт	Стоимость с НДС	Сумма, руб
Халат	1	1500,00	1500,00
Перчатки	2	100,00	200,00
Итого:			1700,00

Таблица 35 – Материальные затраты на научно-технические исследования

Вид затрат	Сумма, руб
Материальные затраты на реактивы	1085,70
Материальные затраты на лабораторную посуду	17410,76
Материальные затраты на средства защиты	1700,00
Материальные затраты на оборудование	45348,00
Итого:	65544,46

#### 4.3.5.2. Основная заработная плата исполнителей темы

В настоящую статью включается основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. Величина расходов по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда. В состав основной заработной платы включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда

заработной платы (размер определяется Положением об оплате труда). Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением проекта, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату.

$$C_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (5.1)$$

где  $Z_{осн}$  – основная заработная плата;

$Z_{доп}$  – дополнительная заработная плата.

Основная заработная плата ( $Z_{осн}$ ) руководителя (лаборанта, инженера) от предприятия (при наличии руководителя от предприятия) рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_{раб}, \quad (5.2)$$

где  $Z_{осн}$  – основная заработная плата одного работника;

$T_{раб}$  – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{дн}$  – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (5.3)$$

где  $Z_m$  – месячный должностной оклад работника, руб.

$M$  – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 24 раб.дня  $M = 11,2$  месяца, 5-дневная неделя; при отпуске в 48 раб. дней  $M = 10,4$  месяца, 6-дневная неделя;

$F_d$  – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб.дн.

Расчет заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта проводили с учетом работы 3-х человек – научного руководителя, ассистента и исполнителя. На выполнение НИР понадобилось 275 рабочих дней. Баланс рабочего времени исполнителей представлен в таблице 36.

Таблица 36 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Ассистент	Исполнитель
Календарное число дней	365	365	365
Количество нерабочих дней	58	58	62
- выходные дни	44	44	48
- праздничные дни	14	14	14
Потери рабочего времени	56	56	28
- отпуск	56	56	28
-невыходы по болезни	-	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	251	251	275

Месячный должностной оклад работника:

$$З_m = З_б \cdot (k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (5.4)$$

где  $З_б$  – базовый оклад, руб.;

$k_{пр}$  –премиальный коэффициент, (определяется Положением об оплате труда);

$k_d$ –коэффициент доплат и надбавок(в НИИ и на промышленныхпредприятиях – за расширение сфер обслуживания, за профессиональное мастерство, за вредные условия: определяется Положением об оплате труда);

$k_p$ –районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

При расчете заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта учитывались месячные должностные оклады работников, которые рассчитывались по формуле:

$$З_m = З_б \cdot K_p \quad (5.5)$$

где  $З_б$  – базовый оклад, руб.;

$K_p$  – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Расчет основной заработной платы научно производственного и прочего персонала проекта проводился без учета премиального коэффициента  $K_{пр}$  (определяется Положением об оплате труда) и коэффициент доплат и надбавок  $K_d$ .

В соответствии с приказом 16544 от 18.12.19, должностной оклад (ППС) доцента НИИ ТПУ составляет 35120,00 руб., исполнителя (1 квалификационный уровень) – 12130,00 руб., консультанта – 14584,32 руб. Расчет основной заработной платы приведен в табл. 37.

Таблица 37 – Расчет основной заработной платы.

Исполнители	З <sub>б</sub>	К <sub>пр</sub>	К <sub>д</sub>	К <sub>р</sub>	З <sub>м</sub> , руб	З <sub>дн</sub> , руб	Т <sub>р</sub> , раб. дн.	З <sub>осн</sub>
Консультант	35120,00	-	-	1,3	45656,00	2174,09	2,50	5435,23
Ассистент	14584,32	-	-	1,3	18959,6	907,20	12,50	11340,0
Исполнитель	12130,00	-	-	1,3	15769,0	754,50	132	99594,0

#### *Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала*

В данную статью включается сумма выплат, предусмотренных законодательством о труде, например, оплата очередных и дополнительных отпусков; оплата времени, связанного с выполнением государственных и общественных обязанностей; выплата вознаграждения за выслугу лет и т.п. (в среднем – 12 % от суммы основной заработной платы).

Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:

$$З_{\text{доп}} \times k_{\text{доп}} \times З_{\text{осн}}, \text{ где}$$

$З_{\text{доп}}$  – дополнительная заработная плата, руб.; где

$k_{\text{доп}}$  – коэффициент дополнительной зарплат;

$З_{\text{осн}}$  – основная заработная плата, руб.

В табл. 38 приведена форма расчёта основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 38 – Заработная плата исполнителей НТИ

<b>Заработная плата</b>	<b>Консультант</b>	<b>Ассистент</b>	<b>Исполнитель</b>
Основная зарплата	2835,5	11340,0	99594,0
Дополнительная зарплата	340,26	1360,8	11951,76
Итого по статье С <sub>зп</sub>	3175,8	12700,8	111545,76

#### *Отчисления на социальные нужды*

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = K_{\text{внеб}} * (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}) \quad (5.6)$$

где  $K_{\text{внеб}}$  – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.)

Отчисления на социальные нужды составляет 30,2 % от суммы заработной платы всех сотрудников. Отчисления на социальные нужды составляют отчисления в пенсионный фонд, отчисление на социальное страхование, отчисления на медицинское страхование.

Затраты на отчисления на социальные нужды рассчитывали по формуле:

$$Z_{\text{о.с.н.}} = 0,302 * Z_{\text{осн.}} \quad (5.7)$$

где  $Z_{\text{о.с.н.}}$  – затраты на отчисления на социальные нужды, руб.

#### *Накладные расходы*

В эту статью включены затраты на управление и хозяйственное обслуживание, которые могут быть отнесены непосредственно на конкретную тему. Накладные расходы составили 16% от всех расходов –  $C_{\text{накл}} = 36148,03$  руб.

#### *Затраты на проведение НИР*

На основании полученных данных по отдельным статьям затрат составляется калькуляция плановой себестоимости НИР. В проекте не предусмотрены затраты, связанные с выплатой дополнительной заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта, научными и производственными командировками, оплатой работ, выполняемых другими организациями и предприятиями. Смета затрат приведена в таблице 40.

Таблица 40 – Смета затрат на выполнение НИР

Статьи затрат	Затраты, руб.
Сырье и материалы	18796,46
Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	45348,00
Фонд заработной платы	127422,36
Отчисления на социальные нужды	34358,39
Накладные расходы	36148,03
<b>Итого</b>	<b>262073,24</b>

#### 4.4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности проекта

##### 4.4.1. Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I = \sum_{i=1}^n a_i \cdot b_i \quad (11)$$

где  $I_{pi}$  – интегральный показатель ресурсоэффективности для  $i$ -го варианта исполнения разработки;

$a_i$  – весовой коэффициент  $i$ -го варианта исполнения разработки;

$b_{ia}, b_{ip}$  – балльная оценка  $i$ -го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

$n$  – число параметров сравнения.

Результаты по расчету интегрального показателя ресурсоэффективности представлены в таблице 41.

Таблица 41 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Колоночная хроматография Исп.1	Высокоэффективная жидкостная хроматография Исп.2
Чувствительность	0,30	5	5
Простота аппаратного оформления	0,20	5	2
Быстрота определения	0,30	5	3
Отсутствие пробоподготовки	0,20	5	4
Итого	1,00	5,0	3,6

$$I_{p-исп1} = 5 \times 0,3 + 5 \times 0,2 + 5 \times 0,3 + 5 \times 0,2 = 5$$

$$I_{p-исп2} = 5 \times 0,3 + 2 \times 0,2 + 3 \times 0,3 + 4 \times 0,2 = 3,6$$

### **Заключение по разделу**

1. Проведена оценка коммерциализации результатов проекта, выявлены потенциальные потребители разработки. Создана организационная структура, календарный план и схема управления проектом.

2. Осуществлено планирование и формирование бюджета исследования. Рассчитаны материальные затраты на выполнение научно-технического исследования. Рассмотрены возможные риски при выполнении проекта и способы их преодоления.

3. Определена ресурсосберегающая, финансовая, бюджетная и экономическая эффективность исследования. Создана матрица ответственности проекта. Выполнен сравнительный анализ эффективности выбранного метода исследования по сравнению с альтернативным. Выбранный метод показал достаточно высокую эффективность ( $I_{p-исп1} = 5$ ).

## **5. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ**

### **Введение**

Работа проводилась в Центре внедрения технологий и в химической научно-исследовательской лаборатории кафедры фармацевтического анализа СибГМУ под руководством профессора ИШХБМТ Белоусова Михаила Валерьевича и связана выделением, исследованием химической структуры и технологических свойств полисахаридов из листьев березы. В работе использовался этиловый спирт в качестве осаждающего агента.

Лаборатория для выделения и изучения полисахаридов представляет собой помещение площадью 25 м<sup>2</sup>, с двумя двустворчатыми окнами, оборудованное двумя рабочими местами. Рабочее место укомплектовано химическим столом и вытяжным шкафом, стульями лабораторными, растворители ( в т.ч. этанол) хранятся в специальном металлическом сейфе. Освещение представлено двумя рядами люминесцентных светильников типа ОД, каждый ряд состоит из двух светильников. Технологическая часть работы выполнялась на базе опытно-производственного участка ЦВТ СибГМУ, состоящего из нескольких помещений, общей площадью 180 м<sup>2</sup>.

Целью данной части магистерской диссертации является анализ условий труда при выполнении экспериментально-производственной части проекта, необходимых для обеспечения охраны окружающей среды, создания безопасных условий труда, предотвращения ЧС.

В разделе рассматриваются вопросы охраны труда и техники безопасности, а также разрабатываются мероприятия по предотвращению воздействия на здоровье сотрудников лабораторий опасных и вредных факторов.

### **5.1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности**

Согласно Трудового кодекса Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 27.12.2018) нормируются:

- 1) режим рабочего времени - для работников, условия труда на рабочих местах, которых по результатам специальной оценки условий труда отнесены к вредным условиям труда 3 или 4 степени, или опасным условиям труда, - не более 36 часов в неделю. При этом максимально допустимая продолжительность ежедневной работы (смены) не может превышать 8 часов.
- 2) защита персональных данных работника – согласно ТК РФ Статей 86-90. В данных статьях описаны: общие требования к получению от работника персональной информации и правила ее обработки, хранения и передачи при необходимости, а



также ответственности за нарушение норм, связанных с обработкой и защитой персональных данных;

- 3) оплата и нормирование труда- осуществляется с нормами трудового кодекса; Оплата труда в районах Крайнего Севера и приравненных к ним местностях осуществляется с применением районных коэффициентов и процентных надбавок к заработной плате. Размер районного коэффициента и порядок его применения для расчета заработной платы работников организаций, расположенных в районах Крайнего Севера и приравненных к ним местностях, устанавливаются Правительством Российской Федерации.
- 4) особенности обязательного социального страхования и пенсионного обслуживания – согласно Федерального закона "Об основах обязательного социального страхования" от 16.07.1999 N 165-ФЗ (в редакции от 03.08.2018) установлены права и обязанности застрахованных лиц на своевременное получение страхового обеспечения в порядке и на условиях, которые установлены федеральными законами о конкретных видах обязательного социального страхования.

При разработке технологии и производстве АФС на основе полисахаридов березы следует руководствоваться следующей нормативной документацией

- ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
- ГОСТ 12.1.044-89 (ИСО 4589-84) Система стандартов безопасности труда.
- [ПБ 09-170-97](#) Общие правила взрывобезопасности для взрывопожароопасных химических, нефтехимических и нефтеперерабатывающих производств. Утверждены Госгортехнадзором России 22 декабря 1997 г.
- Положение о единой системе организации работы по охране труда и технике безопасности в медицинской промышленности. Утверждено Минмедпромом СССР, 1984 г.

При проектировании места исследователя необходимо учитывать требования эргономики для создания комфортных условий труда, направленных на сохранение здоровья работника. Согласно ГОСТ 12.2.032-78 «ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования», конструкция рабочего места и взаимное расположение всех его элементов (сиденье, органы управления, средства отображения информации и т.д.) должны соответствовать антропометрическим, физиологическим и психологическим требованиям, а также характеру работы.

## 5.2. Производственная безопасность

В таблице 42 приведена классификация возможных вредных и опасных факторов, согласно ГОСТ 12.003-2015.

Таблица 42 – Возможные опасные и вредные факторы.

Вредные факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Этап работ			Нормативные документы [7-20]
	Разр абот ка	Изго товл ение	Эксп луат ация	
1.Отклонение показателей микроклимата	+	+	+	ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны [7] СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений [8]
2.Превышение уровня шума	+	-	-	ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности [9]. ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ. Средства и методы защиты от шума. Классификация [10].
3.Отсутствие или недостаток естественного света	+	-	-	СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий [11].
4.Недостаточная освещённость рабочей зоны	+	+	+	СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95 [12]
5.Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека	+	+	+	ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [13]. ГОСТ 12.1.030-81 ССБТ. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление [14]. ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов [15]. ГОСТ 12.1.045-84 ССБТ. Электростатические поля. Допустимые уровни на рабочих местах и требования к проведению контроля [16].
6. Взаимодействие с химическими реагентами и смесями	+	+	+	ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности [17]. ГОСТ 12.1.010-76 ССБТ. Взрывобезопасность. Общие требования [18].
7. Физические перегрузки, связанные со статичностью позы	+	+	+	Р 2.2.2006–05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда [19].
8.Нервно-психические перегрузки, связанные с перенапряжением анализаторов и умственные перегрузки	+			СанПиН 2.2.2/2.4.1340–03. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Гигиенические требования к персональным электронно-вычислительным машинам и организации работы» [20].

**Анализ вредных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при  
проведении исследований.**

**Показатели микроклимата**

Согласно СанПиН 2.2.4.548-96 и ГОСТ 12.1005–88 выполняемая работа относится к категории Ia: работы с интенсивностью энерготрат до 120 ккал/ч (до 139 Вт). Поэтому в лабораторных помещениях создаются оптимальные микроклиматические условия для нормального функционального состояния человека. В таблице 43 приведены допустимые нормы микроклимата в рабочей зоне производственных помещений (Категория работ Ia).

Таблица 43 – Допустимые нормы микроклимата в рабочей зоне производственных помещений (Категория работ Ia).

Сезон года	Категория работ по уровню энерготрата, ккал/ч	Температура воздуха, С <sup>0</sup>		Относительная влажность, %	Скорость движения воздуха, м/сек	
		Диапазон ниже оптимальных	Диапазон выше оптимальных		Если $t^0 < t^0_{\text{оптим.}}$	Если $t^0 > t^0_{\text{оптим.}}$
Теплый	Ia (до 139)	21,0-22,9	25,1-28,0	15-75	0,1	0,2
Холодный		20,0-21,9	24,1-25,0		0,1	0,1

Для обеспечения нормальных условий труда санитарные нормы СанПиН 2.2.1/2.1.1.1031-01 устанавливают, что на одного рабочего должно приходиться 4,5 м<sup>2</sup> площади помещения и 20 м<sup>3</sup> объема воздуха.

Помещение лаборатории имеет следующие параметры:

длина помещения - 5 м;

ширина - 5 м;

высота - 3 м.

Исходя из этих параметров, площадь данного помещения составляет:

$$S = 5 \times 5 = 25 \text{ м}^2;$$

$$\text{объем: } V = 5 \times 5 \times 3 = 75 \text{ куб. м.}$$

В лаборатории работает 2 человека. Значит, на каждого человека приходится 12,5 м<sup>2</sup> рабочей площади и 37,5 м<sup>3</sup> объема воздуха. Это удовлетворяет санитарным нормам. Фактическая температура воздуха в теплый период составляла 25-28°С, в холодный период 20-23°С, что соответствует требуемым нормам.

### Химические опасные и вредные производственные факторы

При выполнении научной работы вредными факторами являются пары летучих используемых реактивов и растворителей. Для защиты от вредных и опасных факторов предусмотрены следующие меры предосторожности: работу ведут в вытяжном шкафу с вентиляцией с применением защитного респиратора. Все работники в лаборатории обязаны работать специальных одеждах и должны не реже 1 раза в год проходить инструктаж по требованиям, предъявляемым к нему при работе в указанных помещениях с соответствующей записью в журнале. Характеристики возможных вредных веществ, при получении полисахаридов из листьев березы представлены в таблице 44.

Таблица 44. Характеристика вредных веществ по ГН 2.1.5.689-98

№ п/п	Название вещества (формула)	Физические свойства	Класс опасности, Величина ПДК (мг/м3)	Общий характер воздействия	Первая помощь
1.	Этиловый спирт	Легко воспламеняющаяся бесцветная жидкость с характерным запахом. Область воспламенения 3,6-19%	4, 100	Токсическое воздействие на центральную нервную систему, поражает слизистые оболочки	При попадании на слизистые, промыть большим количеством воды и использовать средства содержащие пантенол

Обозначения\*: ПДК – предельно допустимая концентрация; Класс опасности: 1 класс – чрезвычайно опасные; 2 класс – высокоопасные; 3 класс – умеренно опасные; 4 класс – малоопасные.

### Уровень шума на рабочем месте

Согласно СП 51.13330.2011 Защита от шума. (Редакция СНиП 23-03-2003), в химической лаборатории установлены предельно допустимые уровни звукового давления и звука, указанные в таблице 45.

Таблица 45 – Значение предельно допустимого звукового давления.

Показатель	Значения								
Частота, Гц	31,5	63	125	250	500	1000	2000	4000	8000
Уровень звукового давления в октавных полосах, дБ	103	91	83	77	73	70	68	66	64
Эквивалентный уровень звука, дБА	75								

Согласно таблице, предельно допустимый уровень звукового давления составляет  $L_{\max} = 75$  дБ. Иными словами, шум, создаваемый работой компьютеров, по своим характеристикам удовлетворяет санитарным нормам.

### **Освещенность рабочей зоны**

В помещении в качестве источников искусственного освещения используются люминесцентные лампы типа ОД. Лампы ОД (открытые двухламповые) предназначены для помещений с хорошим отражением потолка и стен, допускаются при умеренной влажности и запыленности. Согласно санитарно – гигиеническим требованиям рабочее место должно освещаться естественным и искусственным освещением. Лаборант постоянно работает за персональным компьютером, напрягая при этом зрение. По нормам освещения и отраслевым нормам освещения, согласно СП 52.13330.2011 «Естественное и искусственное освещение». (Редакция СНиП 23-05-95) в помещении при работе с ПК рекомендуется 300 - 500 лк при общем освещении.

Помещение имеет размеры:

A - длина помещения - 5 м;

B- ширина - 5 м;

h - высота - 3 м.

Рекомендуемая освещенность помещения, при среднем контроле различия с темным фоном, составляет  $E = 300$ лк (ГОСТ Р 55710-2013). Коэффициент отражения светового потока от потолка, стен, соответственно равны:  $q_p=70\%$ ,  $q_c=50\%$ . Уровень от рабочей поверхности до потолка составляет:

$$H = h - h_p - h_c$$

Где, h - высота помещения

$h_p$  - высота рабочей поверхности;

$h_c$  - расстояние светильников от перекрытия.

$$H = 3\text{ м} - 0,80\text{ м} - 0\text{ м} = 2,2\text{ м}$$

Для освещения используются светильники типа ОД мощностью 40 Вт, для которых оптимальность расположения светильников составляет  $\lambda=1.4$ . Расчетная длина между двумя рядами светильников:

$$L = \lambda * h = 1,4 * 2,2 = 3.08\text{ м}$$

Число рядов светильников:

$$n = B/L = 5/3,08 = 1,62 \approx 2$$

где, B – ширина помещения, м; L-расчетная длина между двумя рядами светильников, м.

Выбираем  $n=1$  ряда светильников. Тогда индекс помещения рассчитываем по формуле:

$$i = \frac{S}{(A+B) \cdot H} = \frac{25}{(5+5) \cdot 2,2} = 1,14, \text{ где}$$

$S$  – площадь помещения,  $\text{м}^2$ ;  $A$  – длина помещения, м;  $B$  – ширина помещения, м,  $H$  – высота светильников над рабочей поверхностью

Коэффициент отражения светового потока от потолка (свежепобеленного), стен (свежепобеленных, с окнами без штор), соответственно равны:  $q_p=70\%$ ,  $q_c=50\%$ , индекс освещения 1,1, коэффициент использования светового потока можно определить по таблице приведенной в Методических указаниях к выполнению индивидуальных заданий для студентов дневного и заочного обучения всех направлений и специальностей ТПУ. Безопасность жизнедеятельности. Расчёт искусственного освещения.– Томск: Изд. ТПУ, 2008. – 20 с., который в данных условиях будет равен 0,51.

Световой поток лампы ЛБ, мощностью 40 Вт составляет  $F_0=2800$  лм[28]. Тогда световой поток светильника ОД, состоящего из двух ламп:  $F=2F_0=2 \cdot 2800=5600$  лм.

Преобразуем формулу светового потока светильника  $\Phi = \frac{E \cdot S \cdot Z \cdot K}{N \cdot \eta}$  [28] и

определим необходимое число светильников в ряду:

$$N = \frac{E \cdot S \cdot Z \cdot K}{F \cdot \eta} = \frac{300 \cdot 25 \cdot 1,15 \cdot 1,5}{5600 \cdot 0,51} = \frac{12937,5}{2856} = 4,53 \approx 5$$

где,  $E=300$  – требуемая освещенность, лк

$S=25$  – площадь освещаемого помещения,  $\text{м}^2$

$Z=1,15$  – коэффициент неравномерности освещения;

$K=1,5$  – коэффициент запаса (помещения с малым выделением пыли)[28].

$F=5600$  – световой поток светильника, лм.

$\eta=0,51$  – коэффициент использования светового потока.

При длине светильника  $l_{св} = 0,933$  м, их общая длина составляет:

$$l_{общ} = N \times l_{св} = 5 \times 0,933 = 4,66 \text{ м}$$

Таким образом, в лаборатории необходимо установить по 5 светильников в два ряда.

## **Анализ выявленных опасных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследования**

### **Электробезопасность**

Обеспечение электробезопасности в лаборатории должно быть организовано в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.013-78 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Строительство. Электробезопасность. Общие требования». Источниками электроопасности могут быть: сушильный шкаф, электрические плитки, магнитные

мешалки, комплекс вольтамперометрический, компьютер для обработки данных. Работу с электрооборудованием и электрическими приборами, находящимися под напряжением, нужно выполнять с применением электрозащитных средств (диэлектрических резиновых перчаток, галош, ковров, изолирующих подставок).

При напряжении в 42В и более, электроприборы надежно заземлены и при аварийной ситуации происходит защитное выключение.

Все розетки должны быть промаркированы для определения ее напряжения. Строго запрещается работать на неисправных электрических приборах и установках. При чрезвычайных происшествиях нужно оказать первую медицинскую помощь, которая состоит из двух этапов это освобождение пострадавшего от действия тока и оказания ему доврачебной медицинской помощи. Нужно избавить как можно быстрее пострадавшего от действия тока, и сразу же оказать медицинской помощи, так как исход поражения зависит от длительности прохождения тока через человека.

### **5.3. Экологическая безопасность.**

Выбросы в атмосферу постоянные и периодические технологические, вентиляционные и неорганизованные выбросы в атмосферу через трубы, аэрационные фонари и вентиляционные шахты и предельно допустимые концентрации веществ в атмосферном воздухе населенных мест, выделяемых в производстве, приведены в таблице 46.

Технологические стоки от промывки оборудования безопасны, можно сливать в канализацию. Суточное количество сточных вод, образующихся при уборке производственных помещений, мытье оборудования, приведено в таблице 47.

Твердые и жидкие не утилизируемые отходы, направляемые на термическое обезвреживание или спецзахоронение.

Количество твердых отходов, образующихся при производстве готовой продукции, приведено в таблице 48.

Количество выбросов от производственных помещений рассчитано в соответствии с материальным балансом.

Таблица 46 – Выбросы в атмосферу

Номер источника выброса (по ПДВ)	Наименование и номер оборудования, подключенного к источнику выброса, Наличие ГПУУ	Наименование выброса: -периодический, ч, -непрерывный, -в случае аварии	Наименование вещества, загрязняющего атмосферный воздух населенных мест	Кол-во выброса на единицу конечного продукта производства, г/г	ПДК (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест, мг/м <sup>3</sup>
1	2	3	4	5	6
Вентиляционная система	Блендер технологический LB20ES (Б-17)	Периодический, 1,0	Лактоза		ОБУВ
			субстанция L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан		ОБУВ
	Вибростенд Экоприбор (ВС-18)	Периодический, 1,0	субстанция L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан		ОБУВ
			Лактоза		ОБУВ
			Тальк		0,1
Вентиляционная система	Смеситель порошков СМ3.134-00.000 ТП (СП-19)	Во время технологического процесса	субстанция L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан		ОБУВ
			Лактоза		ОБУВ
			Тальк		0,1
Вентиляционная система	Сушильная камера, КС-200-СПУ (ШС-21)	Во время технологического процесса	Пыль от содержимого гранул, в том числе-субстанции L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан		ОБУВ
Вентиляционная система	Капсулонаполнительная машина Profiller 1100 (КНМ-23)	Во время технологического процесса	Пыль от содержимого капсул, в том числе-субстанции L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан		ОБУВ



Таблица 47 – Сточные воды

Наименование стоков	Номер стадии, наименование и номер оборудования, где образуется сток	Количество стоков, м <sup>3</sup> в сутки	Периодичность сброса, ч(сут)	Физико-химическая характеристика, состав стоков и (или) наименование других показателей, мг/дм <sup>3</sup>	ПДК (ОДУ) загрязняющих веществ в воде водных объектов, мг/дм <sup>3</sup>	Куда направляется сток
1	2	3 4	5	6	7	8
Смывы с технологического оборудования	Стадия ВР.3 LB20ES (Б-17) Вибростенд (ВС-18) Смеситель порошков СМ3.134-00.000 ТП (СП-19) Сушильная камера, КС-200-СПУ (ШС-21) Капсулонаполнительная машина Profiller 1100 (КНМ-23)	0,3	1,0	Плотность 0,995 г/см <sup>3</sup> РН 6,5 ХПК <sub>бнхр.</sub> 640 мг/л Сухой остаток 550 мг/л Прокаленный остаток – отс. Токсичность – нетоксичен в разведении 1:6 и выше Биоокисляемость – биологически трудно окисляем БПК <sub>5</sub> /ХПК 0,42	Сток не токсичен	В канализацию промышленного стока
Смывы со стен и полов		-		Сток после нейтрализации не оказывает токсичного воздействия на скорость по-требления кислорода при биоокислении загрязнений неадаптированным активным илом городских биологических очистных сооружений (БОС). Скорость окисления загрязнений 19,3 мгБПК/г ч	Сток не токсичен	То же

Таблица 48 – Твердые и жидкие отходы

Наименование отходов	Номер стадии, наименование и номер оборудования, где образуется отход	Способ складирования	Куда вывозится и каким транспортом	Количество отходов, кг		Характеристика отходов		
				на единицу (кг) конечного продукта производства	в сутки	химический состав, %	физикохимические показатели, (плотность $\text{кг/м}^3$ , влажность, %)	класс токсичности отхода
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Неизмельчённые порошки	Стадия ВР.3.1 Блендер технологический LB20ES (Б-17)	В контейнер	Автотранспортом на сжигание	0,0015	0,0015	L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан 100% Лактоза 100% Тальк 100 %	твёрдые вещества	ОБУВ
Отсевы порошков	Стадия ВР.3.3 Вибростенд Экоприбор (ВС-12)	В контейнер	Автотранспортом на сжигание	0,0017	0,0017	субстанция L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан 100% Лактоза 100% Тальк 100 %	твёрдые вещества	ОБУВ
Масса для капсулирования и сметки с оборудования, пола	Стадия ТП 4 Смеситель порошков СМ3.134-00.000 ТП (СП-19)	В контейнер	Автотранспортом на сжигание	0,0126	0,0126	Смесь: субстанция L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан 13,88% Лактоза 83,12% Тальк 3 %	твёрдые вещества	ОБУВ
Капсулы некондиционные, не подлежащие регенерации, сметки с оборудования и пола	Стадия ТП.5 Капсулонаполнительная машина Profiller 1100 (КНМ-23)	В контейнер	Автотранспортом на полигон твердых отходов.	При наличии	При наличии	Смесь: субстанция L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан 13,88% Лактоза 83,12% Тальк 3 %	твёрдые вещества	ОБУВ

#### **5.4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях**

Чрезвычайная ситуация (ЧС) – это совокупность таких обстоятельств, которые сопровождаются разрушениями зданий, сооружений, материальных ценностей, поражению и гибелью людей.

Чрезвычайную ситуацию можно квалифицировать следующим образом:

1. ЧС, связанная с производственными авариями (пожары, взрывы, выброс вредных веществ в окружающую среду);
2. ЧС, связанная со стихийными бедствиями (землетрясения, наводнения, ураганы, смерчи, снежные бури, заносы, оползни, обвалы, эпидемии, лесные и торфяные пожары);
3. ЧС конфликтного характера (вооруженное нападение, волнения в отдельных районах, вызванные выступлениями экстремистских групп, применения оружия массового поражения).

При выполнении научной работы может возникнуть чрезвычайная ситуация замыкание проводки и возгорание. По возможности, пламя необходимо потушить песком, но перед этим необходимо сообщить руководителю. Соблюдая все правила с электрическим оборудованием можно избежать ЧС. К чрезвычайным ситуациям в лаборатории относится возникновение пожара на рабочем месте. В случае пожара ЧС предусмотрены первичные средства пожаротушения: огнетушители ОХП-10 и ОУ-5 для тушения электрооборудования.

Для защиты работающих от вредных выбросов в случае аварийных выбросов необходимо использовать средства индивидуальной защиты (халат, перчатки, очки из органического стекла, респираторы).

Во избежание таких ситуаций предпринимается ряд мер:

- прохождение инструктажа по технике безопасности;
- постоянный контроль и отбраковка, имеющей сколы и трещины, лабораторной посуды;
- применение средств индивидуальной и коллективной защиты.

Для исключения получения травм и порезов не рекомендуется работать с битой и имеющей сколы посудой.

В случае возникновения пожара эвакуация людей проводится согласно плану эвакуации. Возможные ЧС приведены в таблице 49.

Таблица 49 – Возможные ЧС, способы их предупреждения и устранения.

Возможные производственные неполадки, аварийные ситуации	Предельно допустимые значения параметров, превышение (снижение) которых может привести к аварии	Причины возникновения производственных неполадок, аварийных ситуаций	Действия персонала по предупреждению и устранению
1	2	3	4
Прекращение подачи электроэнергии	Образование искры в момент внезапной подачи электроэнергии		Отключить электропитание оборудования Выяснить причину. При подаче электроэнергии включить электрооборудование в рабочий режим
Сбои в работе оборудования	Перебои в подаче электроэнергии		Отключить оборудование. Выяснить причину и ликвидировать аварию.
Локальные возгорания и пожар			Подать сигнал пожарной тревоги. Сообщить в пожарную часть. Приступить к тушению пожара Отключить общий рубильник
Превышение ПДК и НКРП аэрозолей веществ, используемых в производстве	Данные приведены в табл. 14а, 14б, 15	Разгерметизация оборудования, неисправность вентсистемы (в том числе, в связи с отключением электроэнергии)	Прекратить работу Отключить общий рубильник Обеспечить вентиляцию Произвести влажную уборку

### **Пожарная безопасность**

В целях защиты жизни, здоровья, имущества людей, работающих в лаборатории, и имущества лаборатории принимается закон технического регулирования и устанавливает требования пожарной безопасности (Федеральный закон от 22.07.2008 N 123-ФЗ (ред. От 02.07.2013) «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности»).

Категории производственных помещений Центра внедрения технологий СибГМУ приведены в таблице 50. Научно-исследовательская лаборатория кафедры

фармацевтического анализа СибГМУ относится к категории Д, к зоне с пониженной пожароопасностью.

Пожар на рабочем месте может возникнуть при использовании неисправного электрооборудования, при коротком замыкании, при использовании открытых нагревательных приборов, при очистке, перегонке легковоспламеняющихся растворителей.

Таблица 50 – Взрывопожарная и пожарная опасность зданий и помещений.

Наименование производственных зданий, помещений	Категория взрывопожарной и пожарной опасности помещений и зданий (НПБ 105-95)	Перечень горючих веществ (продуктов) для классификации взрывоопасных зон по ГОСТ Р.51330.09-99	Средства пожаротушения
1	2	3	4
Помещение подготовки сырья № 95	В-3; П-Па	L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан, лактоза, тальк	Огнетушители ОУ-5, ОП-5, ОП-10
Помещение приготовления массы для капсулирования №106	В-3; П-Па	субстанция L-рамнопиранозил-6-алкил-d-галактуронан, лактоза, тальк	
Помещение капсулирования №106	В-3; П-Па	Масса для капсулирования, капсулы	
Помещение фасовки и упаковки № 100	В-3; П-Па	Бумага, полиэтиленовая банка	Огнетушители ОУ-3, ОП-5,
Помещение складирования №94	В-3; П-Па	Бумага, сыпучие материалы	Огнетушители ОУ-5, ОП-5

В соответствии с правилами пожарной безопасности в химической лаборатории на видном месте должен быть жидкостный или углекислотный огнетушитель у входной двери. Горящие нерастворимые в воде вещества нельзя тушить водой (битум, масло, бензин, бензол), а также загоревшуюся электропроводку тушить водой нельзя. В этих случаях нужно применять углекислотный огнетушитель, сухой песок, или покрывать очаг пожара асбестом.

Для исключения пожаров и ликвидации их последствий должен быть предусмотрен водопровод. В производственных и подсобных помещениях необходимо установить пенные и углекислотные огнетушители, ящики с песком, ведра и другие средства огнетушения в соответствии с нормами. На случай пожара должен быть составлен план эвакуации.

Все электрооборудование должно быть заземлено через вилку питания, а его тип должен соответствовать классификации помещений по опасности поражения электрическим током. Для ламп центрального освещения необходимо использовать напряжение 220 В, с резервным питанием от аккумуляторной батареи.

### **Заключение**

1. Рассмотрены условия труда на рабочем месте в химической лаборатории кафедры фармацевтического анализа СибГМУ, проведен анализ вредных производственных факторов.
2. Рассмотрено влияние химических веществ на экологическую безопасность (атмосферу, гидросферу и литосферу), описаны меры предупреждения загрязнения окружающей среды.
3. При разработке данного раздела выявлена недостаточная освещенность рабочего места. В связи с этим произведен расчет необходимого количества светильников, согласно норме, число рядов светильников составило:  $n = V/L = 5/3,08 = 1,62 \approx 2$ , количество светильников ряду составило:  $N=5$ . Таким образом, для создания необходимого освещения требуются два ряда светильников по 5 штук в каждом

### **Список литературы по разделу**

1. Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 27.12.2018)
2. ПНД Ф 12.13.1-03. Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения)
3. Инструкция по охране труда при работе в химической лаборатории ИОТ - 003 – 10.
4. Приказ Минздравсоцразвития от 12 апреля 2011 г. N 302н "Об утверждении перечней вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры (обследования), и Порядка проведения обязательных предварительных и периодических медицинских осмотров (обследований) работников, занятых на тяжелых работах и на работах с вредными и (или) опасными условиями труда"
5. [ГОСТ 12.2.032-78](#) ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования.
6. ГОСТ 12.0.003-2015 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация.

7. ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
8. СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений
9. ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности.
10. ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ. Средства и методы защиты от шума. Классификация.
11. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий.
12. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95
13. ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты
14. ГОСТ 12.1.030-81 ССБТ. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление.
15. ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов.
16. ГОСТ 12.1.045-84 ССБТ. Электростатические поля. Допустимые уровни на рабочих местах и требования к проведению контроля.
17. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
18. ГОСТ 12.1.010-76 ССБТ. Взрывобезопасность. Общие требования.
19. Р 2.2.2006–05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда.
20. СанПиН 2.2.2/2.4.1340-03 Гигиенические требования к персональным электронно-вычислительным машинам и организации работы
21. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений
22. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
23. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1031-01 Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов.
24. ГН 2.1.5.689-98 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования
25. СП 51.13330.2011 Защита от шума. Актуализированная редакция СНиП 23-03-2003
26. СП 52.13330.2011 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95

27. ГОСТ Р 55710-2013 Освещение рабочих мест внутри зданий. Нормы и методы измерений
28. Безопасность жизнедеятельности. Расчёт искусственного освещения. Методические указания к выполнению индивидуальных заданий для студентов дневного и заочного обучения всех направлений и специальностей ТПУ. – Томск: Изд. ТПУ, 2008. – 20 с.
29. ГОСТ 12.1.013-78 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Строительство. Электробезопасность. Общие требования.
30. Федеральный закон от 22.07.2008 N 123-ФЗ (ред. От 02.07.2013) «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности».



## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения проекта было проведено выделение полисахаридов из растительного сырья, определение химической структуры полисахаридов физико-химическими методами, исследование гипополидеммической активности, экспериментальное обоснование технологических параметров лабораторной технологии получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы. Проведена оценка коммерциализации результатов проекта, выявлены потенциальные потребители разработки. Установлено, что полученные результаты имеют практическую и теоретическую значимость, разработанные технологии могут быть востребованы в медицине и здравоохранении, кардиологии, фармакологии, фармацевтической технологии, фармацевтической промышленности. Определена ресурсосберегающая, финансовая, бюджетная и экономическая эффективность исследования. Создана матрица ответственности проекта. Выполнен сравнительный анализ эффективности выбранного метода исследования по сравнению с альтернативным. Выбранный метод показал достаточно высокую эффективность ( $I_{p-исп1} = 5$ ). Рассмотрены возможные риски при выполнении проекта и способы их преодоления. Проведено обобщение и детализация требований к охране условий труда и окружающей среды. В результате выполнения проекта была создана организационная структура, календарный план и схема управления проектом. Осуществлено планирование и формирование бюджета исследования. Рассчитаны материальные затраты на выполнение научно-технического исследования. Это позволило достичь поставленной цели - оптимизировать лабораторную технологию получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов березы.

### Список публикаций

1. Rovkina, K. I., Krivoshchekov, S. V., Guriev, A. M., Yusubov, M. S. ogly, & Belousov, M. V. (2019). DEVELOPMENT OF METHODS FOR OBTAINING POLYSACCHARIDES FROM BIRCH LEAVES (BETULA PENDULA ROTH., BETULA PUBESCENS EHRH.). Chemistry of Plant Raw Material, (3), 23-31. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019035420>
2. Разработка методики количественного определения полисахаридов листьев березы / К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, Е.А. Безверхняя, М.В. Белоусов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2019. – Том 14, № 1 (79). – С.47-50
3. Валидация методики количественного определения полисахаридов листьев березы / К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2019. – Том 14, № 2 (80). – С. 48-51. 5. Ровкина, К.И. Скрининг гипополипидемической активности растительных полисахаридов / К.И. Ровкина, Е.Е. Буйко, В.В. Иванов, А.М. Гурьев, М.В. Белоусов // Традиционная медицина. – 2019. – №2(57). – С. 39-44.
4. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью Данилец М.Г., Гурьев А.М., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Шерстобоев Е.Ю., Белоусов М.В., Юсубов М.С., Тобольжина С.А., Ровкина К.И., Кривошеков С.В. патент на изобретение RU 2657819 27.01.2017 8. Средство на основе L-рамнопиранозил-6-О-метил-D-галактуронана, обладающее гипополипидемической активностью Гурьев А. М., Белоусов М. В., Юсубов М. С., Иванов В. В., Ровкина К.И. патент на изобретение RU 2019119525 24.06.2019

### Список использованной литературы

1. Аникин, В.В. О влиянии чесночного препарата Алисата на состояние липидного обмена у больных стенокардией / В.В. Аникин // Актуальные вопросы фармакологии: сб. науч.тр., посвящ. 90-летию проф. М.М. Десницкой) / Тверская гос. мед. академия. - 1999. - С.92-93.
2. Антидислипидемические и противовоспалительные эффекты полисахаридов бурых водорослей у пациентов с ишемической болезнью сердца и дислипидемией / С.П. Крыжановский // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – Т. 57. – № 3. – С. 33-34.
3. Биологическая активность комплекса водорастворимых полисахаридов из наземной части гибискуса тройчатого / Т.А Лысенко, М.Н. Ивашев, А.Н. Сепп, Е.Е. Зацепина // Международный журнал экспериментального образования. – 2012. – №12-1. – С. 103-104.
4. Биологическая активность сульфатированных полисахаридов из морских водорослей / С.П. Крыжановский, Т.С. Запорожец, Н.Н. Беседнова // Атеросклероз. – 2013. – Т. 9. – № 1. – С. 77-98.
5. Влияние фукоидана на уровень и динамику показателей липидного обмена у мышей с дислипидемией, индуцированной р-407 / Т.А. Кузнецова, Е.В. Персиянова, И.Д. Макаренкова, Н.Н. Беседнова, Р.В. Меньшова, Т.Н. Звягинцева // Атеросклероз. – 2016. – Т.12. – № 2. – С. 5-10.
6. Гиполипидемические и противовоспалительные эффекты полисахаридов морских бурых водорослей у пациентов с дислипидемией / С.П. Крыжановский, Л.Н. Богданович, Н.Н. Беседнова, Л.А. Иванушко, В.Д.Головачева // Фунд. исследования. – 2014. – №10. – С. 93-100.
7. Гмурман, В. Е. Теория вероятности и математическая статистика / В. Е. Гмурман. – Москва: Высшая школа, 2006. – 284 с.
8. Динамика накопления водорастворимых полисахаридов в сырье *Petasites japonicus* (Siebold&Zucc.) Maxim / О.Г. Зорикова, С.В. Журавлева, Т.М. Бойцова, А.Ю. Маняхин // Химия растительного сырья. – 2015. – № 4. – С. 155-158.
9. Духанина Инна Владимировна. Изучение гиполипидемического действия цветочной пыльцы-обножки : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.00.25 / Духанина Инна Владимировна; [Место защиты: ГОУВПО "Пятигорская государственная фармацевтическая академия"].- Пятигорск, 2006.- 115 с.: ил.
10. Енгальчева, Е.Е. Фармакологическая оценка полисахаридного комплекса цветков пижмы обыкновенной дис. ... канд. биол. наук: 14.03.06 / Е.Е. Енгальчева – Рязань, 2016. – 143 с.
11. Карачаров, А.Т. Коррекция гиперлипидемии у больных ИБС препаратами чеснока / А.Т. Карачаров, И.М. Храмченко // II - ая науч.-практ. конф. 574-го Воен. клинич. Госпиталя "Современные технологии диагностики и лечения раненых и больных в поликлинике и стационаре" (20 мая 1999г., г. Москва). - М., 1999. - С.80-81.
12. Кобалава, Ж.Д. Спорные и нерешенные вопросы стратегии интенсивного ведения кардиологических пациентов с множественными факторами риска / Ж.Д. Кобалава // Рос. Нац. конгр. «Человек и лекарство 2005» (18-22 апреля 2005г., г.Москва). -М., 2005.- С.4-7.

13. Комбинированная терапия аторвастатином и полисахаридами морской бурой водоросли *Fucus evanescens* пациентов с дислипидемией / С.П. Крыжановский, Б.И. Гельцер, Л.А. Иванушко, Т.А. Кузнецова, С.П. Ермакова, Н.Н. Беседнова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – Т. 68. – № 1. – С. 36-43.
14. Кочетков, Н.К. Химия углеводов / Н.К. Кочетков. – М.: Изд. «Химия», 1967. – 672 с.
15. Куимов А.Д., Влияние хлоридно-гидрокарбонатно-натриевой минеральной воды «Карачинская» на обмен липидов / А.Д. Куимов, А.Б. Кривошеев, П.П. Хавин // БЮЛЛЕТЕНЬ СО РАМН. -2006. - №1 (119). –С.41-47.
16. Кухарчук, В.В. Актуальные вопросы лечения атеросклероза / В.В. Кухарчук // Терапевт, арх. - 1996. - №12. - С.5-7.
17. Литвинчук, М.Д. Метод определения желчегонной активности растительных экстрактов [Текст] / М.Д. Литвинчук, З.И. Новосилец // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1980. – № 6. – С. 16-19.
18. Мартынов А.И., Чельцов В.В. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты в кардиологической практике: Метод. рекомендации. М., 2007. №2, 4. 16 с.
19. Мансурханова И. М., Приготовление некоторых лекарственных форм на эмульсионной основе. Дис. канд. фармацевт. наук. 1967. Стр. 171-173
20. Методы исследования углеводов / Р. Уистлер, Д. Бемиллер – М.: Мир, 1975. – 512 с.
21. Моисеев, С В . Квай: нужен ли чеснок при атеросклерозе? / С В .Моисеев // Клинич.фармакология и терапия. - 1997. - №6(4). - С.61- 62.
22. Мухаммед, А.А. Исследование гиполлипидемических свойств чеснока, растительных масел на примере оливкового, льняного и амарантового, а также пищевых волокон на примере пектина, альгината и хитозана / А.А.Мухаммед, М.Л.Максимов // Вестник новых медицинских технологий. -2014. - №1. Электронный журнал. - DOI: 10.12737/4786.
23. Панышина М.В., Волков В.Г., Хадарцева К.А. Опыт профилактики гестоза // Вестник новых медицинских технологий. 2010. №4. С. 141–142.
24. Панышина М.В., Силаева Е.Б., Раннева Л.К. Возможности диагностики и совместного применения немедикаментозных способов профилактики и реабилитации преэклампсии (научный обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий (электронный журнал). 2013. №1. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4557.pdf>.
25. Панышина М.В. Технология немедикаментозной профилактики преэклампсии // Вестник новых медицинских технологий (электронный журнал). 2013. №1. URL:<http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4320.pdf>.
26. Пегова Р.А., Воробьева О.А., Мельникова Н.Б. Растительные масла. Состав и перспективы использования масла семян тыквы – *Cucurbita Pepo* в терапии. Медицинский Альманах. 2014. № 2 (32). С. 127-134.
27. Пегова Р.А., Фармацевтические композиции гиполлипидемического действия эфиров уксусной и янтарной кислот бетулина / Р.А. Пегова, О.Е. Жильцова, И.Н. Клабукова и др. // МЕДИЦИНСКИЙ АЛЬМАНАХ. -2015. - № 3 (38), сентябрь. – С.216-219.
28. Пономарев, В.Д. Отсеивающие эксперименты в технологии / В.Д. Пономарев // Фармация – 2008. – №1 – С. 31-32.
29. Применение полисахаридов из бурых водорослей в комплексе с базисной терапией у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей / Т.С.

- Запорожец, К.В. Майстровский, В.Г. Раповка, Т.Н. Звягинцева // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – Т. 57 № 3. С. 25-27.
30. Разработка биологически активной добавки «ореховая» и оценка ее потребительских свойств / А.В. Стриженко [и др.] // Новые технологии. 2011. № 6. С.85.
  31. Роднова, Екатерина Александровна. Механизмы гипополипидемического действия сесквитерпенового лактона леукомизина : диссертация ... кандидата биологических наук : 14.03.06 / Роднова Екатерина Александровна; [Место защиты: Науч.-исслед. ин-т фармакологии Томского научного центра СО РАМН].- Томск, 2013.- 98 с.: ил. РГБ ОД, 61 14-3/541.
  32. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под общ. ред. д-ра мед. наук А.Н. Миронова. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 445-453.
  33. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – М., 2005. – 832 с.
  34. Собенин, И.А. Многофакторная профилактика атеросклероза и атеросклеротических заболеваний / И.А. Собенин, А.Н. Орехов // Medicina-Altera. -1999. - No3. - С.7-16.
  35. Тышко, Н.В. Сравнительная характеристика влияния экспериментальных рационов на рост и развитие крыс [Текст] / Н.В. Тышко, В.М. Жминченко, В.А. Пашорина и др. // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80, № 5. – С. 30-38.
  36. Фишер, Р.А. Статистические методы для исследователей / Р.А. Фишер. – М.: Госстатиздат, 1958. – 268 с
  37. Фосфолипиды и нейтральные липиды крови у пациентов с дислипидемией и их коррекция полисахаридами из морских бурых водорослей / С.П. Крыжановский, Л.Н. Богданович, Н.Ф. Кушнерова, Н.М. Шевченко // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10-10. – С. 1951-1958.
  38. Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens*: новые перспективы в лечении атеросклероза / С.П. Крыжановский, Т.А. Кузнецова, Б.И. Гельцер, Т.С. Запорожец, С.П. Ермакова, Н.Н. Беседнова // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2017. – Т.16. – № 1. – С.82-87.
  39. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства / Под ред. Н.Н. Беседновой. – Владивосток: Дальнаука, 2014. – 380 с.
  40. A comparative study of the hypolipidaemic effects of a new polysaccharide, mannan *Candida albicans* serotype A, and atorvastatin in mice with poloxamer 407-induced hyperlipidaemia / Korolenko T., Johnston T.P., Lykov A.P. // Journal Of Pharmacy And Pharmacology. - 2016. - Vol. 68, Is. 12. - pp. 1516-1526.
  41. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications / Liu J., Willfor S., Xun C. // Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. - 2015. - N 5. pp. 31-61.
  42. Antidiabetic Activity of Polysaccharides from Tuberous Root of *Liriope spicata* var. *prolifera* in KKAY Mice / Yihui Liu, Luosheng Wan, Zuoqi Xiao, Jingjing Wang, Yonglong Wang, and Jiachun Chen // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. - 2013. - Vol. 2013. - Article ID 349790. 11 P. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/349790>.
  43. Antihyperlipidemic and hepatoprotective activities of residue polysaccharide from *Cordyceps militaris* SU-12 / Liqin Wang, Nuo Xu, Jianjun Zhang, Huajie Zhao, Lin Lin, Shouhua Jia, Le Jia // Carbohydrate Polymers. - 2015. - Vol. 131. - pp. 355-362.

44. Anti-obesity and lipid lowering effects of *Cymodocea nodosa* sulphated polysaccharide on high cholesterol-fed-rats / Kolsi Rihab Ben Abdallah, Ben Gara Amel, Chaaben Rim et al. // Archives Of Physiology And Biochemistry. - 2015. Vol. 121. - Is. 5. - pp. 210-217.
45. Assessment of antihyperlipidemic effect and physic-chemical characterization of water soluble polysaccharides from *Ulva fasciata* Delile / Matloub A.A. El-Sherebini M., Borai I.H., Ezz M.K., Rizk M.Z., Aly H.F., Fouad G.I. // J. Applied Sciences Research. 2013. - V. 9(4) - pp. 2983–2993.
46. Ballantyne CM, Weiss R, Moccetti T, Vogt A et al. EXPLORER Study Investigators. Efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg alone or in combination with ezetimibe in patients at high risk of cardiovascular disease (results from the EXPLORER study). Am J Cardiol 2007;99:673–680.
47. Brugts JJ, Yetgin T, Hoeks SE, Gotto AM et al. The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomized controlled trials. BMJ 2009;338:b2376.
48. Burkhardt, J.E. Effects of cholestyramine and diet on small intestinal histomorphometry in rats [Текст] / J.E. Burkhardt, M.L. Biehl, K.P. Kowsz et al. // Toxicol. Pathol. – 1998. – Vol. 26, N 2. – P. 271-275.
49. Cardiovascular effects in vitro of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* / Geng Z.H., Huang L., Song M.B., Song Y.M. // Carbohydrate Polymers. - 2015. - Vol.121. - pp. 241-247.
50. Characterization of phenolics of *Sarcandra glabra* by non-targeted high-performance liquid chromatography fingerprinting and following targeted electrospray ionisation tandem mass spectrometry/time-of-flight mass spectrometry analyses / Zhou H., Liang J., Lv D., Hu Y., Zhu Y., Si J., Wu S. // Food Chem. - 2013. - Vol. 138. - pp. 2390-2398.
51. Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells / Ren D.Y., Wang N, Guo J.J., Yuan L., Yang X.B. // Carbohydrate Polymers. - 2016. - Vol. 138. - pp. 123-133.
52. Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170000 participants in 26 randomised trials. Lancet 2010;376:1670–1681.
53. Comparisons on enhancing the immunity of fresh and dry *Cordyceps militaris* in vivo and in vitro / Zhu S.J., Pan J., Zhao B., Liang J., Ze-Yu W. et al. // J. Ethnopharmacol. - 2013. - Vol. 149. - pp. 713-719.
54. Diet-induce atherosclerosis/hypercholesterolemia in rodent models [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: <http://www.researchdiets.com/product-literature>.
55. Dillard, A. Use of hamster as a model to study diet-induced atherosclerosis [Текст] / A. Dillard, N.R. Matthan, A.H. Lichtenstein // Nutr. Metab. (Lond). – 2010. – Vol. 7, N 89. – P. 1-12.
56. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. A. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, N 1. – P. 497–509.
57. Ganoderma lucidum repress injury of ethanol-induced steatohepatitis via anti-inflammation, anti-oxidation and reducing hepatic lipid in C57BL/6J mice / Dai-Jung Chung, Mon-Yuan Yang, Yi-Ru Li, Wei-Jen Chen, Chiu-Ya Hung, Chau-Jong Wang // Journal of Functional Foods. - 2017. - Vol. 33. - pp. 314-322.

58. Garcia-Rodriguez LA, Masso -Gonzalez EL, Wallander MA, Johansson S. The safety of rosuvastatin in comparison with other statins in over 100,000 statin users in UK primary care. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2008;17:943–952.
59. Getz, G. S. Diet and murine atherosclerosis / G. S. Getz, C. A. Reardon // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26, N 2. – P. 242–249.
60. . Heidker, R.M. Grape seed procyanidins and cholestyramine differentially alter bile acid and cholesterol homeostatic gene expression in mouse intestine and liver [Tekct] / R.M. Heidker, G.C. Caiozzi, M.L. Ricketts // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, N 4. – P. e0154305.
61. Hippisley-Cox J, Coupland C. Unintended effects of statins in men and women in England and Wales: population-based cohort study using the QResearch data- base. *BMJ* 2010;340:c2197.
62. Hepatoprotection of enzymatic-extractable mycelia zinc polysaccharides by *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* / Nuo Xu, Zheng Gao, Jianjun Zhang, Huijuan Jing, Shangshang Li, Zhenzhen Ren, Shouxian Wang, Le Jia // *Carbohydrate Polymers.* - 2017. - Vol. 157. - pp. 196-206.
63. Holoshitz N, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Relative safety of gemfibrozil and fenofibrate in the absence of concomitant cerivastatin use. *Am J Cardiol* 2008;101:95–97.
64. Huijgen R, Abbink EJ, Bruckert E, Stalenhoef AF et al. Triple Study Group. Colesevelam added to combination therapy with a statin and ezetimibe in patients with familial hypercholesterolemia: a 12-week multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Clin Ther* 2010;32:615–625.
65. Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice / Meneses ME, Martínez-Carrera D, Torres N, Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M, Morales P, et al // *PLoS ONE.* 2016. - Vol. 11(7): e0159631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159631>.
66. Hypolipidemic and antioxidant effects on hypercholesterolemic rats of polysaccharide from *Salicornia bigelovii* seed / Dong-Hoon Lim, Dubok ChoiSun-Mi Kim, YuLan PiaoOn-You Choi, Geum-Sook Lim, Young-Cheol Chang, Hoon Cho // *Korean Journal of Chemical Engineering.* - 2017. - Vol. 34. - Is. 3, pp. 787-796.
67. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of aqueous and methanolic extracts of *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* and *Ganoderma applanatum*, from Northeastern Mexico, in Wistar rats / Eduardo Javier Tamez de la O, Lourdes Garza-Ocañas, Maria Teresa ZanattaCalderón, Rubén Lujan-Rangél, Fortunato Garza-Ocañas, Christian Tadeo BadilloCastañeda, Xochitl Sofia Ramírez Gómez // *Journal of Medicinal Plants Research.* - 2013. - Vol. 7(11). - pp. 661-668.
68. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of Allopolyherbal formulations in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats / Kumar R., Arora V., Ram V., Bhandari A., Vyas P. // *Int. J. Diabetes Mellitus.* - 2015. - Vol. 3(1). - pp. 45-50.
69. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of a polysaccharide from *Lachnum* YM240 and its derivatives in mice, induced by a high fat diet and low dose STZ / Yufen Wang, Nana Su, Guohua Hou, Jinglei Li, Ming Ye // *MEDCHEMCOMM.* - 2017. - Vol. 8. - Is. 5. - pp. 964-974.
70. Hypolipidaemic and hypoglycaemic activities of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* in Kunming mice / LiChen, Yipeng Zhang, Ou Sha, Wei Xu, Shujun Wang // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 2016. - Vol. 93. - pp. 1206-1209.
71. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of *Sarcandra glabra* polysaccharide in type 2 diabetic mice / Wei Liu, Ying Zheng, Zhenzhen Zhang, Wenbing Yao, Xiangdong Gao // *Food & Function.* - 2014. - Vol. 5. - Is.11. - pp. 2850-2860.

72. Impact of hydrothermal and mechanical processing on dissolution kinetics and rheology of oat beta-glucan / Myriam M.-L. Grundy, Janina Quint, Anne Rieder, Simon Ballance, Cécile A. Dreiss, Peter J. Butterworth, Peter R. Ellis // Carbohydrate Polymers. - 2017. - Vol. 166. - pp. 387-397.
73. In vitro digestion of beta-glucan rich cereal products results in extracts with physicochemical and rheological behavior like pure beta-glucan solutions – A basis for increased understanding of in vivo effects / Anne Rieder, Svein Halvor Knutsen, Simon Balance // Food Hydrocolloids. - 2017. - Vol. 67. - pp. 74-84.
74. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, Miller E et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin and pravastatin across doses (STELLAR trial). Am J Cardiol. 2003 Jul 15;92 (2):152–60.
75. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). Am J Cardiol. 1998 Mar 1;81 (5):582–7.
76. Kim, H. Polysaccharide gel coating of the leaves of *Brasenia schreberi* lowers plasma cholesterol in hamsters [Текст] / H. Kim, Q. Wang, C.F. Shoemaker et al. // J. Tradit. Complement Med. – 2014. – Vol. 5, N 1. – P. 56–61.
77. Kuroki, S. Effects of cholestyramine on hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase and serum 7alpha-hydroxycholesterol in the hamster [Текст] / S. Kuroki, T. Naito, K. Chijiwa K et al. // Lipids. – 1999. – Vol. 34, N 8. – P. 817-823.
78. Long-term blood cholesterol-lowering effects of adietary fiber supplement / Knopp R.H., Superko H.R., Davidson M., Insull W., Dujovne C.A., Kwiterovich P.O., Zavoral J.H., Graham K., O'Connor R.R., Edelman D.A. // Am. J. Prev. Med. - 1999. - Vol. 17. - pp. 18-23.
79. Mills EJ, Rachlis B, Wu P, Devereaux PJ et al. Primary prevention of cardiovascular mortality and events with statin treatments. A network meta-analysis involving more than 65,000 patients. J Am Coll Cardiol 2008;52: 1769–1781.
80. Modica, S. Characterizing bile acid and lipid metabolism in the liver and gastrointestinal tract of mice[Текст] / S. Modica, S. Murzilli, A. Moschetta // Curr. Protoc. Mouse Biol. – 2011. – Vol. 1, N 2. – P. 289-321.
81. Modulatory effects of one polysaccharide from *Acanthopanax senticosus* in alloxan-induced diabetic mice / Fu J. F., Fu J. F., Liu Y. et al. // Carbohydrate Polymers. - 2012. - vol. 87. - N. 3. - pp. 2327-2331.
82. *Momordica charantia* polysaccharides ameliorate oxidative stress, hyperlipidemia, inflammation, and apoptosis during myocardial infarction by inhibiting the NF-κB signaling pathway / Mohammad Raish // International Journal of Biological Macromolecules. - 2017. - Vol. 97. - pp. 544-551.
83. Oat β-glucan: Physico-chemical characteristics in relation to its blood-glucose and cholesterol-lowering properties / Wang Q., Ellis P.R. // British Journal of Nutrition. - 2014. - Vol. 112(2). - pp. 4-13.
84. Okada, M. Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: a new superior method / M. Okada, H. Matsui, Y. Ito et al. // J. Lab. Clin. Med. – 1998. – Vol. 132, N 3. – P. 195–201.
85. Optimized Extraction and Antioxidant Activities of Polysaccharides from Two Entomogenous Fungi / Sapan Kumar Sharma // Bioanalysis & Biomedicine. - 2015. - Vol. 7(6). - pp. 180-187.
86. Pijlman AH, et al. Atherosclerosis. 2010;209:189-194.



87. Polysaccharides from *Laminaria japonica* show hypoglycemic and hypolipidemic activities in mice with experimentally induced diabetes / Jia Xibei, Yang Juan, Wang Zhi, et al. // Experimental Biology And Medicine. - 2014. - Vol. 239. - Is. 12. - pp. 1663-1670.
88. Preparation, characterisation of N-aryl chitosan and screening for its hypocholesterolemic activity / Sachin R. Kumbhoje, Swapneel B. Sonone, Suhas S. Awati, Rajanikant B. Ghotane, Shitalkumar S. Patil // Der Pharma Chemica. - 2013. - Vol.5(3). - pp. 256-260.
89. Preventing cardiovascular heart disease: Promising nutraceutical and non-nutraceutical treatments for cholesterol management / Johnston, T. P., Korolenko, T. A., Pirro, M., et al. // Pharmacological Research. - 2017. - Vol. 120. - pp. 219-225.
90. Protective effect of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* on isoproterenol (ISO)-induced myocardial injury in rats / Zhao-HuaGeng, LanHuang, Ming-BaoSong, Yao-MingSong // Carbohydrate Polymers. - 2015. - Vol. 132. - pp. 638-642.
91. Purification, Characterization and Biological Activity of Polysaccharides from *Dendrobium officinale* / Huang K., Li Y., Tao S., Wei G., Huang Y., Chen D., Wu C. // Molecules. 2016. - V. 6. - N 21. - 701; DOI:10.3390/molecules21060701.
92. SHARP Collaborative Group. Study of Heart and Renal Protection (SHARP): randomized trial to assess the effects of lowering low-density lipoprotein cholesterol among 9,438 patients with chronic kidney disease. Am Heart J 2010; 160:785–794.
93. Stein EA. Managing dyslipidemia in the high-risk patient. Am J Cardiol. 2002 Mar 7;89 (5A): 50C-57C.
94. Structural Characterization and Biological Activities of a Novel Polysaccharide from Cultured *Cordyceps militaris* and Its Sulfated / Jing Y., Zhu J., Liu T., Bi S., Hu X., Chen Z., Song L., Lv W., Yu R. J. Agric. Food Chem. - 2015. - V. 13. - N 63. - pp 3464-3471. DOI: 10.1021/jf505915t.
95. Structural similarities of fucoidans from brown algae *Silvetia babingtonii* and *Fucus evanescens*, determined by tandem MALDI-TOF mass spectrometry / S.D. Anastyuk, N.M. Shevchenko, P.S. Dmitrenok, T.N. Zvyagintseva // Carbohydr Res. - 2012; 358:78–81. DOI: 10.1016/j.carres. 2012.06.015. PMID: 22824505.
96. Sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* suppress SREBP-2 and HMG-CoA reductase expression and attenuate non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet / Rendong Ren, Junjie Gong, Yanyan Zhao, Xinyun Zhuang, Yin Ye, Wenting Lin // Food & Function. - 2017. - Vol. 8. - Is. 5. - pp. 1899-1904.
97. Taylor F, Ward K, Moore TH, Burke M et al. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. Cochrane Database Syst Rev 2011;1:CD00481642.
98. The Anticoagulant Activity and Hypocholesterolemic Effect of a Hot Water Extract from the Red Alga *Ibaranori* (*Hypnea charoides*) / Yoshimasa Sugiura, Ryusuke Tanaka, Ken-ichi Hanaoka, Teruo Matsushita // Food Sci. Technol. Res. - 2012. - Vol. 18 (5). - pp. 735-740.
99. The Complex World of Polysaccharides / Edited by Desiree Nedra Karunaratne. - 2012. - 648 P. <http://dx.doi.org/10.5772/2947>.
100. The physicochemical properties, in vitro binding capacities and in vivo hypocholesterolemic activity of soluble dietary fiber extracted from soy hulls / Chun Liu, Xiao-Lu Lin, Zhili Wan, Yuan Zou, Fen-Fen Cheng, Xiao-Quan Yang // Food & Function. - 2016. - Is. 12. pp. 4830-4840.
101. Reiner Z. Combined therapy in the treatment of dyslipidemia. Fundam Clin Pharmacol 2010;24:19–28.

102. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P et al. SEAS Investigators. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med* 2008;359: 1343–1356.
103. Reeves, P.G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [Текст] / P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Jr. Fahey // *J. Nutr.* – 1993. – Vol. 123, N 11. – P. 1939-1951.
104. Van Veldhoven, P. P. Lipase-based quantization of triacylglycerols in cellular lipid extracts: requirement for presence of detergent and prior separation by thin-layer chromatography / P. P. Van Veldhoven, J. V. Swinnen, M. Esquent, G. Verhoeven // *Lipids.* – 1997. – Vol. 32, N 12. – P. 1297–1300.
105. Vegetative growth and phylogenetic relationship of commercially cultivated strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD / Ala N., Shi M.J, Lee M.W, Shin P.G., Yoo Y.B, Lee T.S. // *Mycobiology.* - 2013. - Vol. 37. - pp. 258-266.
106. Zhang, G.H. An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase / G.H. Zhang, A.R. Cong, G.B. Xu et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 326, N 1. – P. 87–92.
107. Zhao XQ, Krasuski RA, Baer J, Whitney EJ et al. Effects of combination lipid therapy on coronary stenosis progression and clinical cardiovascular events in coronary disease patients with metabolic syndrome: a combined analysis of the Familial Atherosclerosis treatment study (FATS), the HDL-Atherosclerosis treatment study (HATS) and the Armed Forces regression Study (AFREGS). *Am J Cardiol* 2009;104: 1457–1464.
108. Реестр лекарственных средств России [Электронный ресурс] : офиц. сайт. URL: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 19.07.2017).
109. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] : офиц. сайт. URL: [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_1101.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_1101.htm) (дата обращения: 19.07.2017).
110. Компания Орион [Электронный ресурс] : офиц. сайт. URL : <http://www.orion.fi/en/> (дата обращения: 19.07.2017).
111. Реестр лекарственных средств России [Электронный ресурс] : офиц. сайт. URL : [https://www.rlsnet.ru/baa\\_tn\\_id\\_15441.htm](https://www.rlsnet.ru/baa_tn_id_15441.htm) (дата обращения: 19.07.2017).
112. Компания Эвалар [Электронный ресурс] : офиц. сайт. URL : <https://shop.evalar.ru/catalog/item/hitozan-evalar/> (дата обращения: 19.07.2017).
113. Компания «Счастье жизни+» : офиц. сайт. URL : <http://sgplus.org/bady/alga/morskaya-kapusta.html> (дата обращения: 19.07.2017).
114. Компания Литораль [Электронный ресурс] : офиц. сайт. URL : <https://littoral.ru/> (дата обращения: 19.07.2017).
115. Компания Промавтоматика [Электронный ресурс] : офиц. сайт. URL : <http://pectin.inc.ru/apple-pectin/> (дата обращения: 19.07.2017).
116. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук [Электронный ресурс] : офиц. сайт. URL : <http://www.piboc.dvo.ru/develop/22/138/> (дата обращения: 19.07.2017).
117. Jones PH et al. Prevalence of Dyslipidemia and Lipid Goal Attainment in Statin-Treated Subjects From 3 Data Sources: A Retrospective Analysis. *J Am Heart Association*, 2012 Dec;1(6):e001800.
118. Основы таблеточного производства: монография / С. М. Махкамов. - 2-е изд. - Ташкент : Фан, 2004. - 146 с

119. Haglund, O. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E / O. Haglund, R. Luostarinen, R. Wallin // J. Nutr. – 1991. – Vol. 121. – P.165–169.
120. . Franssen R, Vergeer M, Stroes ES, Kastelein JJ. Combination statin–fibrate therapy: safety aspects. Diabetes Obes Metab 2009;11:89–94